

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Investigação da atividade tocolítica do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) e dos seus constituintes majoritários, carvacrol e timol, em útero de rata

MARIA DA CONCEIÇÃO CORREIA SILVA

**João Pessoa-PB
2013**

MARIA DA CONCEIÇÃO CORREIA SILVA

Investigação da atividade tocolítica do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) e dos seus constituintes majoritários, carvacrol e timol, em útero de rata

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

**João Pessoa-PB
2013**

S586i Silva, Maria da Conceição Correia.

Investigação da atividade tocolítica do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) e dos seus constituintes majoritários, carvacrol e timol, em útero de rata/Maria da Conceição Correia Silva. – João Pessoa: [s.n.], 2013.
103 f.: il.

Orientadora: Bagnólia Araújo da Silva.
Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. *Lippia microphylla* Cham.
2. Óleo essencial.
3. Carvacrol.
4. Timol.
5. Atividade tocolítica.

BS/CCS/UFPB

CDU: 615 (043.2)

MARIA DA CONCEIÇÃO CORREIA SILVA

Investigação da atividade tocolítica do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) e dos seus constituintes majoritários, carvacrol e timol, em útero de rata

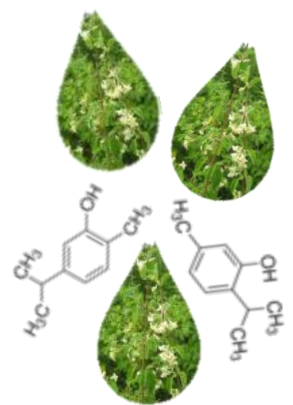
Aprovado em 04/09/2013

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora**

**Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador**

**Prof. Dr. Cibério Landim Macêdo
(Faculdade de Ciências Médicas da Paraíba)
Examinador**



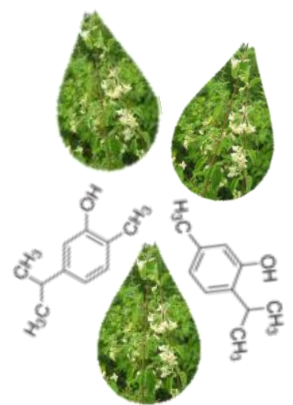
Dedicatórias

Em especial aos meus pais, João Ferreira da Silva e Maria das Mercês Correia Silva, pela vida e por minha formação dentro dos princípios éticos e morais. Meu reconhecimento e gratidão pela paciência, pelo amor, pelos grandes ensinamentos e por quererem sempre o melhor pra mim. Sem vocês nada seria possível.

Aos meus irmãos, D'jalma Correia Silva, Diógenes Correia Silva e Daniel Correia Silva, pelo apoio e por acreditarem que era possível.

Aos meus sobrinhos, Danyelle de Farias Silva, Karla Emanuely de Queiroz Silva e Diogo Aparício de Farias Silva, por me alegrar nos momentos difíceis e não me fazer desistir.

Ao meu avô, José Severino de Farias (*in memoriam*), por possibilitar-me dar o primeiro passo para essa conquista.



Agradecimientos

Sozinhos nós não chegaríamos a lugar algum. Por isso agradeço:

A Deus, pelo dom da vida, por sempre guiar e iluminar meu caminho e minhas escolhas, dando-me força e sabedoria para realização desta conquista. Por colocar pessoas em meu caminho que contribuíram para minha formação e amadurecimento, tanto profissional quanto pessoal.

À Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva, muito mais do que uma orientadora, por toda confiança depositada, pelas conversas, risadas, caipirinhas, amizade, conselhos e ensinamentos, não só os científicos, que sempre serão lembrados. Sempre será uma referência de dedicação e amor a profissão. Obrigada por me orientar a tomar as melhores decisões e a seguir o melhor caminho.

Ao Prof. Dr. Josean Fachine Tavares pela gentileza em ceder o óleo essencial, objeto de estudo deste trabalho.

À Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante pelos ensinamentos, amizade e apoio científico.

Aos Professores Doutores Robson Cavalcante Veras e Cibério Landim Macêdo por aceitarem participar desta importante etapa na minha formação e pelas contribuições a este trabalho.

A todos os professores que compõem o quadro do Curso de Graduação em Farmácia, em especial a: Adalberto Coelho, Alba Caiaffo, Arnaldo Medeiros, Bagnólia Araújo, Eduardo Oliveira, Elizete Ventura, Fábio Santos, Francisca Inês, João Vianney, Leônia Batista, Patrícia Simões, Robson Veras, Rossana Souto e Zélia Braz, por serem exemplos de bons profissionais e engrandecerem o curso de Farmácia.

A todos os colegas e amigos que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, entre eles: Aline de Freitas Brito, Ana Carolina de Carvalho Correia, Cibério Landim Macêdo, Cybelle de Arruda Navarro Silva, Fernando Ramos Queiroga, Fabio de Souza Monteiro, Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira, Gislaine Alves de Oliveira, Giuliana Amanda de Oliveira, Giulyane Targino Aires Moreno, Hannah Olga Pereira Rodovalho, Italo Rossi Roseno Martins, Joedna Cavalcante Pereira, José Lucas Ferreira Marques Galvão, José Rabêlo, Juliana da Nóbrega Carreiro, Kimã Barbosa Meira, Luiz Henrique Agra,

Maria Alice Miranda Bezerra Medeiros, Millena de Melo Medeiros, Polyana Cristina Barros Silva, Rafael de Almeida Travassos, Sarah Rebeca Dantas Ferreira e Tamyris Freires Ferreira pela ajuda, amizade e convivência. Em especial, Ana Caroline de Lima Silva, Iara Leão Luna de Souza, Layanne Cabral da Cunha Araújo, Luiz Henrique César Vasconcelos, Paula Benvindo Ferreira e Renata de Souza Sampaio por toda ajuda, amizade e apoio científico e de bancada.

Aos professores, monitores e alunos das disciplinas: Química Orgânica Experimental I do Departamento de Química, e Farmacodinâmica do Departamento de Ciências Farmacêuticas, das quais fui monitora em 2010 e 2011-2012, respectivamente, por proporcionarem a experiência em sala de aula.

A todos os colegas e amigos que fazem parte da “Turma Feliz, Farmácia 2013.1”, por fazerem parte da minha vida nos últimos 5 anos, pelos momentos de alegria e descontração e pela ajuda nos momentos difíceis. Em especial, Felipe Nóbrega, Francisco Casimiro Júnior, Genivaldo dos Reis Neto, Herta Ellen Moreira, Jéssica Hanne Araújo, Joedna Cavalcante Pereira, Juliana Constantino Monteiro, Lídia Lúcia Bezerra, Liliane de Queirós Souza e Thaylan Martins de Souza.

Ao Centro Acadêmico Livre de Farmácia (CALFARM), em especial a Ana Letícia Braz, Hidna Cunha, Heitor Matos, Írio Palmeira Neto, José Anderson e Yuri Manguiera, pela experiência vivida, pelo companheirismo e pela amizade.

Aos funcionários Odaíza Nunes e Petrônio Coutinho pela dedicação e compromisso com a Coordenação de Farmácia.

Aos funcionários do Hemocentro da Paraíba, da Farmácia Popular do Brasil de Cruz das Armas, da Farmácia do Hospital Santa Izabel e do Hospital Universitário Lauro Wanderley pelos ensinamentos.

Aos técnicos de laboratório, Bernadete Helena Cavalcanti, Francisco Júnior, Igara Oliveira, Renata Medeiros, Ricardo Cartaxo e Uytacira Veloso, pela ajuda e pelos ensinamentos durante as aulas práticas.

Aos funcionários do PPgPNSB, Adriano Cordeiro, José Crispim, Luís Silva e Mônica Rodrigues da Silva pelos trabalhos prestados ao laboratório.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e torceram por esta conquista, em especial, Alda Lídia, Ana Carolina Correia, Ana Maria, Fabiana Carla, Fabrícia Lucimery, Rosildo Diniz, Gicélia Sobral, Renato Almeida, Silene Meira e Vicente Carlos.

Aos meus primos, Joelcio Santos e Joselma Queiroz, e suas famílias por terem me acolhido nestes 5 anos, sem essa ajuda tudo seria mais difícil.

Ao meu tio, José Gonçalves Correia, pela força, torcida e incentivo.

À Universidade Federal da Paraíba, instituição responsável pelo meu aperfeiçoamento profissional e pelo financiamento das bolsas de monitoria e iniciação científica.

A toda minha família, em especial aos meus pais, irmãos, cunhadas, sobrinhos e avô pela força, carinho e confiança depositados em mim.

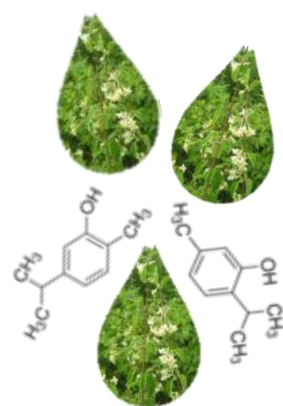
A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada,

Maria da Conceição Correia Silva

*"Use a sua força para guiar seu destino.
Tudo que você deseja com intensidade pode
transformar seu caminho. Quem acredita
nos seus sonhos tem apenas uma direção:
sempre em frente."*

Autor desconhecido

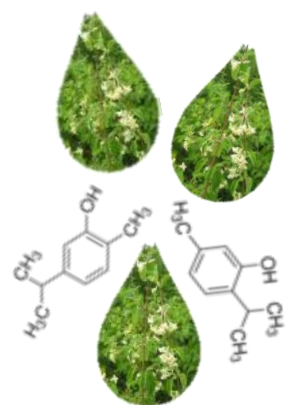


Resumo

RESUMO

Das folhas da espécie *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) foi extraído o óleo essencial (LM-OE), tendo como constituintes majoritários o carvacrol e o timol. O objetivo deste trabalho foi investigar e caracterizar o efeito tocolítico do LM-OE em útero de rata, bem como verificar se este efeito é devido aos seus constituintes majoritários isolados, carvacrol e timol, ou da mistura destes. Para isso, foram realizadas medidas de contrações isotônicas e isométricas em útero isolado de rata. O LM-OE inibiu as contrações fásicas induzidas tanto por 10^{-5} M de carbacol (CCh) como por 10^{-2} UI/mL de ocitocina ($CI_{50} = 7,8 \pm 1,3$ e $35,1 \pm 4,9$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Enquanto que o carvacrol, o timol e a mistura timol-carvacrol (1,46:1) antagonizaram as contrações fásicas induzidas por CCh ($E_{\text{max}} = 41,4 \pm 10,3$; $35,4 \pm 8,3$ e $56,5 \pm 9,2\%$, respectivamente) com baixa eficácia. Já quando as contrações eram induzidas por ocitocina, apenas o timol e a mistura timol-carvacrol apresentaram efeito inibitório ($E_{\text{max}} = 38,8 \pm 4,8$ e $69,8 \pm 2,4\%$, respectivamente). Do mesmo modo, o LM-OE relaxou, de maneira equipotente, o útero pré-contraído com 60 mM de KCl ($CE_{50} = 5,0 \pm 0,8$ $\mu\text{g/mL}$) e com 10^{-2} UI/mL de ocitocina ($CE_{50} = 2,7 \pm 0,8$ $\mu\text{g/mL}$). Como o passo comum na via de sinalização destes agentes contráteis são os canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_V), hipotetizou-se que de alguma forma o óleo estaria impedindo o influxo de Ca^{2+} através destes canais. O LM-OE antagonizou as curvas concentrações-resposta cumulativas ao $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} , sugerindo o bloqueio do influxo de cálcio através dos Ca_V . Essa hipótese foi descartada quando o LM-OE relaxou o útero pré-contraído com 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644, agonista dos Ca_V1 , porém com uma eficácia muito baixa ($E_{\text{max}} = 17,4 \pm 5,0\%$) e sem dependência de concentração, confirmando que o LM-OE não bloqueia diretamente o influxo de cálcio através destes canais. Sabendo-se que os canais de K^+ podem modular negativamente os Ca_V , decidiu-se investigar a participação desses canais no mecanismo tocolítico do LM-OE. Para avaliar essa hipótese foi testado o seu efeito na presença de 5 mM de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de K^+ . Os resultados demonstraram que o LM-OE ($CE_{50} = 30,3 \pm 2,2$ $\mu\text{g/mL}$) parece ativar/modular positivamente os canais de K^+ , entretanto outros são necessários para confirmar quais subtipos desses canais estão envolvidos neste efeito tocolítico. Sendo assim, o efeito tocolítico do LM-OE não envolve diretamente o bloqueio do influxo de cálcio via Ca_V , entretanto envolve a participação dos canais de K^+ , enquanto que os seus constituintes majoritários isolados e a mistura desses apresentam baixa eficácia em útero isolado de rata.

Palavras-chave: *Lippia microphylla* Cham., óleo essencial, carvacrol, timol, atividade tocolítica.



Abstract

ABSTRACT

From leaves of *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) was extracted the essential oil (LM-OE), which has carvacrol and thymol as major constituents. The aim of this work was to investigate and to characterize the tocolytic effect of LM-OE on rat uterus, as well as to verify if this effect is due its isolated major constituents, carvacrol and thymol, or themselves mixture. For this, were performed measures of isotonic and isometric contractions on isolated rat uterus. LM-OE inhibited both phasic contractions induced by carbachol (CCh) 10^{-5} M and by oxytocin 10^{-2} UI/mL ($IC_{50} = 7.8 \pm 1.3$ and 35.1 ± 4.9 μ g/mL, respectively). While the carvacrol, thymol and thymol-carvacrol mixture (1.46:1) antagonized the phasic contractions induced by CCh ($E_{max} = 41.4 \pm 10.3$; 35.4 ± 8.3 and $56.5 \pm 9.2\%$, respectively) with low efficacy. But when the contractions were induced by oxytocin, only thymol and thymol-carvacrol mixture, showed inhibitory effect ($E_{max} = 38.8 \pm 4.8$ and $69.8 \pm 2.4\%$, respectively). Similarly, LM-OE relaxed in an equipotent manner the uterus pre-contracted with 60 mM KCl ($EC_{50} = 5.0 \pm 0.8$ μ g/mL) and oxytocin 10^{-2} UI/mL ($EC_{50} = 2.7 \pm 0.8$ μ g/mL). As the common step in the signaling pathway of these contractile agents is voltage-dependent calcium channels (Ca_v), we hypothesized that somehow LM-OE would preventing Ca^{2+} influx by these channels. The LM-OE antagonized cumulative concentration-response curves to $CaCl_2$ in Ca^{2+} -free depolarizing medium suggesting blocking calcium influx through Ca_v . This hypothesis was discarded when the LM-OE relaxed uterus pre contracted with 3×10^{-7} M of S () Bay K8644, Ca_v1 agonist, but with a very low efficacy ($E_{max} = 17.4 \pm 5.0\%$) and without dependence of concentration, confirming that the LM-OE directly does not block the calcium influx through these channels. Since K^+ channels can negatively modulate the Ca_v , we decided to investigate the role of these channels in the tocolytic effect of LM-OE. To assess this hypothesis has been tested its effect in the presence of CsCl 5 mM, a non-selective potassium channels blocker. The results showed that LM-OE ($EC_{50} = 30.3 \pm 2.2$ μ g/mL) appears to activate/upregulate positively these channels, however other experiments should be conducted to confirm which potassium channels subtypes are involved in this tocolytic effect. Thus, the tocolytic effect of LM-OE does not directly involves blocking of calcium influx through Ca_v , however involves the participation of K^+ channels, while their major isolated constituents and the mixture of these have low efficacy in isolated rat uterus.

Keywords: *Lippia microphylla* Cham., essential oil, carvacrol, thymol, tocolytic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Foto de <i>Lippia microphylla</i> Cham. (Verbenaceae).....	32
Figura 2 – Estrutura química do carvacrol (A) e do timol (B).....	34
Figura 3 – Esquema do mecanismo fármaco-mecânico da contração no músculo liso pela ativação da via $G_{q/11}$ -PLC β_1	38
Figura 4 – Esquema do mecanismo fármaco-mecânico do relaxamento no músculo liso pela ativação da via G_s -AC-PKA e NO-sGC-PKG.....	40
Figura 5 – Registros típicos do efeito relaxante do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (A) e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (B) em útero isolado de rata.....	61
Figura 6 – Registros típicos do efeito relaxante do LM-OE em útero isolado de rata pré-contraído com 60 mM de KCl (A) e com 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 parcialmente despolarizado com 15 mM de KCl (B).. ..	66
Figura 7 – Registros típicos do efeito relaxante do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 5 mM de CsCl em útero de rata.. ..	69

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Efeito relaxante do LM-OE frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-5} M de CCh (**A**) e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (**B**) em útero isolado de rata.....55
- Gráfico 2** – Efeito relaxante do carvacrol frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-5} M de CCh (**A**) e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (**B**) em útero isolado de rata.....56
- Gráfico 3** – Efeito relaxante do timol frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-5} M de CCh (**A**) e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (**B**) em útero isolado de rata.....57
- Gráfico 4** – Efeito relaxante da mistura timol-carvacrol frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-5} M de CCh (**A**) e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (**B**) em útero isolado de rata.58
- Gráfico 5** – Efeito relaxante do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (●) e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (○) em útero isolado de rata.....62
- Gráfico 6** – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} na ausência (●) e na presença do LM-OE nas concentrações de 9 (○), 27 (■), 81 (□) e 243 (▲) $\mu\text{g/mL}$, em útero isolado de rata.64
- Gráfico 7** – Efeito relaxante do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (●) e por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (●).67
- Gráfico 8** – Efeito relaxante do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (○) e na presença (○) de 5 mM de CsCl, em útero de rata.70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de E_{\max} (%) do LM-OE, do carvacrol, do timol e da mistura timol-carvacrol frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-5} M de CCh e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina em útero isolado de rata..	59
Tabela 2 – Valores de E_{\max} (%) e de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina em útero isolado de rata..	62
Tabela 3 – Valores de E_{\max} (%) e de CE_{50} (M) do CaCl_2 na ausência e na presença do LM-OE em útero isolado de rata..	64

LISTA DE ABREVIATURAS

4Ca²⁺-CaM	complexo cálcio-calmodulina
4Ca²⁺-CaM-MLCK	complexo cálcio-calmodulina-cinase da cadeia leve da miosina
[Ca²⁺]_c	concentração de Ca ²⁺ citosólico
[K⁺]_e	concentração extracelular de potássio
AC	ciclase de adenilil
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
BK_{Ca}	canais de potássio ativados por cálcio de grande condutância
CaM	calmodulina
CaMKII	proteína cinase II dependente de Ca ²⁺ -calmodulina
cAMP	monosfotato cíclico de adenosina
Ca_v	canais de cálcio dependentes de voltagem
Ca_v1	canais de cálcio dependentes de voltagem da família 1
Ca_v2	canais de cálcio dependentes de voltagem da família 2
Ca_v3	canais de cálcio dependentes de voltagem da família 3
Ca_v-L	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L
Ca_v-N	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N
Ca_v-P/Q	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo P/Q

Ca_v-R	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo R
Ca_v-T	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo T
CCh	carbacol
CE₅₀	concentração de uma substância necessária para produzir 50% de seu efeito máximo
cGMP	monofosfato cíclico de guanosina
CI₅₀	concentração de uma substância necessária para inibir 50% do seu efeito de um agonista
CICR	liberação de Ca ²⁺ induzida pelo Ca ²⁺
DAG	diacilglicerol
e.p.m.	erro padrão da média
E_{max}	efeito máximo
ERK	proteína cinase regulada por sinal extracelular
G_{q/11}	proteína G _q ou proteína G ₁₁
G_s	proteína G _s
Gα_q	subunidade α da proteína G _q
Gα_s	subunidade α da proteína G _s
GDP	difosfato de guanosina
GPCR	receptor acoplado à proteína G
GTP	trifosfato de guanosina
IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol

IP₃R	receptor de IP ₃
K_{ATP}	canais de potássio sensíveis ao ATP
K_v	canais de potássio dependentes de voltagem
LM-OE	óleo essencial de <i>Lippia microphylla</i> Cham.
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da cadeia leve da miosina
NCX	trocador sódio/cálcio
NO	óxido nítrico
OCI	ocitocina
PIP₂	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	proteína cinase dependente de cAMP
PKG	proteína cinase dependente de cGMP
PLC	fosfolipase C
PLCβ₁	fosfolipase C isoforma beta 1
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática
RhoA	pequena proteína G ligante de GTP
RS	retículo sarcoplasmático
RyR	receptor de rianodina
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do retículo endo-sarcoplasmático
sGC	ciclase de guanilil solúvel

SK_{Ca} canais de potássio ativados por cálcio de pequena condutância

V_m potencial de membrana

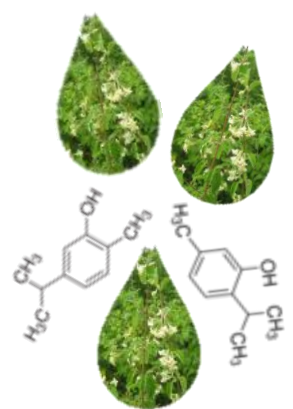
OBS: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
2.1 Produtos naturais e fitoterapia no Brasil	29
2.2 A Família Verbenaceae	30
2.3 O gênero <i>Lippia</i> e a espécie <i>Lippia microphylla</i> Cham.....	31
2.4 Óleos essenciais	33
2.5 Regulação da contração e do relaxamento do músculo liso	35
3 OBJETIVOS	42
3.1 GERAIS.....	43
3.2 ESPECÍFICOS	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 MATERIAL	45
4.1.1 Material botânico	45
4.1.2 Produtos-teste	45
4.1.3 Animais.....	45
4.1.4 Drogas e reagentes	46
4.1.5 Soluções nutritivas	46
4.1.6 Preparo das soluções dos produtos-teste	47
4.1.6.1 Preparo da solução do óleo essencial de <i>Lippia microphylla</i> Cham.....	47
4.1.6.2 Preparo das soluções-estoque do carvacrol, do timol e da mistura timol-carvacrol.....	47
4.1.7 Aparelhos	48

4.2 MÉTODOS	49
4.2.1 Investigação do efeito tocolítico do óleo essencial de <i>Lippia microphylla</i> Cham. e dos seus constituintes majoritários carvacrol e timol.....	49
4.2.1.1 Efeito do LM-OE, do carvacrol, do timol e da mistura timol-carvacrol frente às contrações fásicas induzidas por CCh ou por ocitocina em útero isolado de rata.....	49
4.2.2 Investigação do mecanismo de ação tocolítica do óleo essencial de <i>Lippia microphylla</i> Cham. em útero isolado de rata	50
4.2.2.1 Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina.....	50
4.2.2.2 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca _v) no efeito relaxante do LM-OE	50
4.2.2.2.1 Efeito tocolítico do LM-OE frente às contrações induzidas por CaCl ₂ em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca ²⁺	50
4.2.2.2.2 Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por S(-)-Bay K8644	51
4.2.2.3 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito relaxante do LM-OE	51
4.2.2.3.1 Efeito do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl.....	51
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5 RESULTADOS.....	53
5.1 Investigação do efeito tocolítico do óleo essencial de <i>Lippia microphylla</i> Cham. e dos seus constituintes majoritários carvacrol e timol.....	54
5.1.1 Efeito do LM-OE, do carvacrol, do timol e da mistura timol-carvacrol frente às contrações fásicas induzidas por CCh ou por ocitocina em útero isolado de rata.....	54
5.2 Investigação do mecanismo de ação tocolítica do óleo essencial de <i>Lippia microphylla</i> Cham. em útero isolado de rata	60

5.2.1 Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina	60
5.2.2 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) no efeito relaxante do LM-OE.....	63
5.2.2.1 Efeito tocolítico do LM-OE frente às contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca^{2+}	63
5.2.2.2 Efeito do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644	65
5.2.3 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito relaxante do LM-OE	68
5.2.3.1 Efeito do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl.....	68
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	81
ANEXOS	99
ANEXO 1	100
ANEXO 2.....	101
ANEXO 3.....	102



1 Introdução

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca pelo alívio e pela cura de doenças através da ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VIEGAS-JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Além de serem usados pela população como fonte de remédios, os produtos naturais têm servido como fonte e inspiração para uma grande fração da atual Farmacopeia (KINGSTON, 2011).

A natureza, de uma forma geral, produz a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos, o vegetal contribui de forma bastante significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos desses de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos. Muitas dessas substâncias servem como protótipos para o desenvolvimento de medicamentos semissintéticos mais específicos e seletivos (PINTO et al., 2002).

Estima-se que cerca de 60 mil espécies vegetais sejam oriundas dos diversos biomas brasileiros Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, Caatinga, Manguezal, dentre outros (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Segundo a Convenção da Diversidade Biológica (CDB), o Brasil possui de 15 a 20% de toda a biodiversidade do planeta, sendo considerado, em nível mundial, o maior em número de espécies endêmicas (BARREIRO, 2009). Entretanto, esta biodiversidade não é completamente conhecida e talvez nunca venha a ser, tal a sua magnitude e complexidade. A biodiversidade brasileira representa para nossa população e, particularmente para os pesquisadores brasileiros, uma região de enorme importância científica, social, econômica, cultural e ambiental. Sendo assim, justifica o grande potencial para a descoberta e o desenvolvimento de novos medicamentos baseados em produtos naturais (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Sem a contribuição dos produtos naturais obtidos das plantas, das toxinas animais e dos microrganismos, não teria sido possível o desenvolvimento da terapêutica moderna, composta por medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos. Assim como não seria possível aos cientistas compreenderem os fenômenos complexos relacionados à biologia celular e molecular e à eletrofisiologia, o que permitiu a identificação, o isolamento e a clonagem de enzimas, receptores, canais iônicos e outras estruturas biológicas. Todas essas descobertas possibilitaram à indústria farmacêutica o desenvolvimento

de novos fármacos dotados de maior seletividade e eficácia contra várias patologias de maior complexidade (SHU, 1998 apud CALIXTO, 2003).

As moléculas complexas de interesse farmacológico são desenvolvidas a partir de produtos naturais por indústrias farmacêuticas que oferecem, entre outras, as seguintes vantagens: grande quantidade de estruturas químicas, muitas delas complexas; muitas classes de estruturas homólogas; estruturas químicas di e tridimensionais; possibilidade de utilização como banco de moléculas para ensaios de alta velocidade; fonte de pequenas moléculas para alvos moleculares complexos e, o mais importante, capazes de serem absorvidas e metabolizadas pelo organismo (SHU, 1998 apud CALIXTO, 2003).

Entretanto, alguns problemas que dificultam o aproveitamento da biodiversidade para o desenvolvimento de novos medicamentos, incluem: 1) falta de leis específicas para o acesso a biodiversidade; 2) grande complexidade das moléculas isoladas a partir de produtos naturais; 3) tempo, às vezes longo, para o descobrimento de novas moléculas; 4) descoberta que pode ser dispendiosa; 5) poucas bibliotecas de compostos naturais; 6) poucas informações a cerca da relação entre a estrutura e a atividade desses compostos; 7) moléculas já conhecidas com pouco interesse são frequentemente isoladas de produtos naturais e 8) químicos sintéticos muitas vezes relutantes em trabalhar com produtos naturais (STROBL, 2000 apud CALIXTO, 2003).

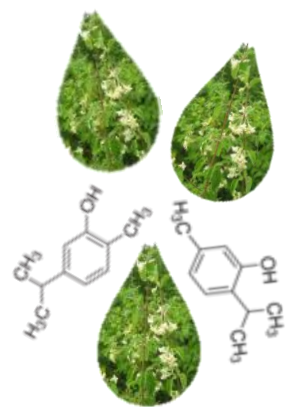
Dentre os vários produtos naturais obtidos de plantas, destacam-se os óleos essenciais, que são constituídos, na maioria das vezes, por misturas complexas que podem ser originadas a partir do ácido mevalônico por duas vias biossintéticas distintas: a série terpênica e, menos frequentemente, a dos fenilpropanoides (SAAD et al., 2009).

Os óleos essenciais são amplamente utilizados nas indústrias farmacêutica, sanitária e agrônômica devido as suas propriedades naturais, como por exemplo, bactericida, fungicida e inseticida (BAKKALI et al., 2008). Devido a grande diversidade química dos seus componentes, outras importantes funções biológicas e/ou fisiológicas são atribuídas a estes produtos, sendo também muito pronunciadas as ações anti-inflamatória e antiespasmódica (MAGALHÃES; LAHLOU; LEAL-CARDOSO, 2004, MADEIRA et al., 2005, ASEKUN; GRIERSON; AFOLAYAN, 2007, DU et al., 2007).

As espécies da família Verbenaceae têm seu potencial econômico amplamente explorado, tanto para a ornamentação (LORENZI; SOUZA 2001) como para o uso terapêutico, neste caso devido à presença dos óleos essenciais (SANTOS et al., 2009). Entre os gêneros da família Verbenaceae merece destaque o gênero *Lippia*, que é popularmente utilizado para o tratamento de doenças dos sistemas respiratório e gastrointestinal (MORTON, 1981 apud PASCUAL et al., 2001). Além disso, a espécie desse gênero como *Lippia alba* é indicada como ansiolítico, sedativo leve, antidiarréico e antiespasmódico (BRASIL, 2011).

Nesse sentido, o interesse em investigar os óleos essenciais com atividade sobre a musculatura lisa reside no fato de que substâncias espasmolíticas têm uma vasta aplicação em vários processos fisiopatológicos, tais como: asma, hipertensão, arritmias cardíacas, angina do peito, disfunção erétil, diarreias, espasmos tanto renais como intestinais e uterinos. Além disso, como os mecanismos de contração e de relaxamento muscular envolvem mobilizações de íons Ca^{2+} e este íon medeia grande parte das ações das drogas no nosso organismo, o músculo liso se apresenta como modelo para a investigação dos mecanismos de ação de substâncias que envolvem a sinalização do Ca^{2+} (WEBB, 2003).

Diante do exposto, investigou-se uma possível atividade tocolítica do óleo essencial obtido das folhas de *Lippia microphylla* Cham., assim como a sua atuação sobre as vias que regulam o processo de contração e de relaxamento para assim, desencadear efeito espasmolítico em preparações de músculo liso uterino, utilizando para tanto técnicas e ferramentas farmacológicas em nível funcional.



2 Revisão Bibliográfica

2.1 Produtos naturais e fitoterapia no Brasil

O uso das plantas medicinais por várias culturas há milhares de anos e as informações sobre a utilização dos recursos naturais desempenham um papel essencial na descoberta de novos produtos a partir de plantas como agentes terapêuticos (SILVA et al., 2012). A Organização Mundial de Saúde (OMS), estima que entre 75 e 80% da população mundial faz uso desse recurso para cuidados primários à saúde e apesar do desenvolvimento da química sintética, aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos são provenientes, direta ou indiretamente das plantas (ALVES; ROSA, 2005; FOWLER, 2006).

Além disso, nas últimas décadas o interesse pela fitoterapia teve um aumento considerável entre os usuários, pesquisadores e serviços de saúde (ROSA; CÂMARA; BÉRIA, 2011). Outro fator que incentiva os estudos com espécies vegetais é a complexidade na descoberta de novas drogas, algumas necessitam de sete a dez anos para chegar ao desenvolvimento completo de um novo medicamento (FLISCHER; MONTARI, 1995; CALIXTO, 2000; SIXEL; PECINALLI, 2005).

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 14 de 31 de março de 2010, medicamento fitoterápico é aquele obtido com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos de sua utilização, de documentos tecnocientíficos ou de evidências clínicas. São caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não sendo considerado medicamento fitoterápico aquele que contém em sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais. Esta resolução possui como objetivo, estabelecer os requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos e revoga a RDC nº 48 de 16 de março de 2004 (BRASIL, 2010).

As principais classes terapêuticas de medicamentos fitoterápicos comercializadas no Brasil são os psicoléticos (sedativos, ansiolíticos e antidepressivos), antivaricosos, anti-hemorroidários, auxiliares digestivos e hepáticos, antiespasmódicos, tônicos, laxantes, descongestionantes, antigripais e para auxiliar na circulação cerebral (VALEZE; BRENZAN, 2011). O Tebonin[®] e o Tanakan[®] (*Ginkgo biloba*) são indicados para distúrbios vestibulares e cerebrais, o

Laitan[®] (*Piper methysticum*) como ansiolítico (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002) e o Acheflan[®] (*Cordia verbenacea* DC.) como anti-inflamatório de uso tópico (HENRIQUE; SIMÕES-PIRES; APEL, 2009) são as especialidades farmacêuticas mais comercializadas em nosso país.

Dessa forma, a biodiversidade brasileira é de suma importância para a pesquisa e o desenvolvimento de novos produtos fitoterápicos. Apesar de que, uma pequena parte de seus constituintes foi estudada e seus benefícios futuros não estão completamente esclarecidos (FERRO; BONACELLI; ASSAD, 2006). Visando contribuir com a pesquisa envolvendo plantas medicinais da flora brasileira, foi escolhida uma espécie pertencente à família Verbenaceae, uma vez que esta família possui diversas plantas medicinais com importâncias químicas, econômicas e farmacológicas conhecidas.

2.2 A família Verbenaceae

Inserida na grande diversidade das plantas medicinais, destaca-se a família Verbenaceae, que reúne aproximadamente 36 gêneros e 1000 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005 apud SAMPAIO, 2009), sendo constituída por subarbustos e ervas que se desenvolvem de períodos anuais a perenes (SALIMENA, 2000 apud SAMPAIO, 2009). As espécies dessa família medram em regiões tropicais, subtropicais e temperadas da América, da África e da Índia, sendo os centros de mais alta diversidade as regiões subtropicais da América do Sul (SANDERS, 2001 apud SAMPAIO, 2009). No Brasil ocorrem aproximadamente 17 gêneros e 250 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005 apud SAMPAIO et al., 2009).

Espécies da família Verbenaceae são amplamente exploradas para ornamentação (LORENZI; SOUZA 2001), bem como para o uso terapêutico, neste último caso devido à presença dos óleos essenciais (SANTOS et al., 2009). Várias atividades farmacológicas já foram descritas para espécies desta família, entre elas: repelente de mosquito do gênero *Aedes* para a espécie *Lantana camara* L. (DUA et al., 2003); antinociceptiva e hipnótica para a espécie *Premna tomentosa* L. (DEVI et al., 2003); leishmanicida para formas promastigotas de várias espécies de *Leishmania* para a espécie *Stachytarpheta cayennensis* (Rich) Vahl. (MOREIRA et al., 2007) e relaxante de corpos cavernosos de coelhos para a espécie *Clerodendron capitatum* (Willd) (ABDELWAHAB et al., 2012).

2.3 O gênero *Lippia* e a espécie *Lippia microphylla* Cham.

Segundo Pascual et al. (2001), o gênero *Lippia*, que pertence à família Verbenaceae, é constituído por cerca de 200 espécies de ervas, subarbustos e árvores de pequeno porte. Espécies desse gênero podem ser encontradas principalmente em países das Américas Central e do Sul, além de territórios da África tropical. O Brasil detém cerca de 70 a 75% das espécies conhecidas desse gênero, sendo a maioria delas concentrada na Cordilheira do Espinhaço, nos estados de Minas Gerais e Goiás, região caracterizada pela ocorrência de pedras, sendo comum o crescimento das espécies de *Lippia* neste tipo de solo (VICCINI et al., 2005).

A maioria das espécies deste gênero é utilizada pela população como remédios para o tratamento de doenças dos sistemas respiratório e gastrointestinal (MORTON, 1981 apud PASCUAL et al., 2001). Além disso, há relatos de que espécies desse gênero apresentaram atividades antimalárica (GASQUET et al., 1993 apud PASCUAL et al., 2001), antiviral (ABAD et al., 1995 apud PASCUAL et al., 2001) e citostática (LÓPEZ et al., 1979; SLOWING BARILLAS, 1992; KLUEGER et al., 1997 apud PASCUAL et al., 2001).

A espécie *Lippia microphylla* Cham. (Figura 1) é encontrada apenas na Guiana e no Brasil (LEMOS et al., 1992 apud PASCUAL et al., 2001), sendo popularmente conhecida como “alecrim-do-mato” e “alecrim-de-tabuleiro”. Esta espécie é utilizada pela população na forma de decocto ou macerado em álcool como um antisséptico ou para o tratamento de doenças respiratórias, como resfriado, gripe, bronquite, tosse e asma (AGRA et al., 2008; PASCUAL et al., 2001).

Figura 1 – *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae).



Fonte: Josean Fachine Tavares, 2007.

Botanicamente, esta espécie caracteriza-se por ser um arbusto muito ramificado e quebradiço, que mede de 2-3 m de altura. Apresenta folhas de cheiro forte e sabor picante, além de flores pequenas e esbranquiçadas (MATOS, 2000; LORENZI; MATOS, 2002; MATOS, 2002, apud ARAÚJO, 2011). Segundo Pascual et al. (2001), esta espécie pode ser chamada de *L. microphylla* Cham. & Schlecht, *L. microphylla* Mart. e *Lantana microphylla* Mart.

Algumas atividades farmacológicas para *L. microphylla* já são conhecidas a partir de dados da literatura, tais como: atividade antimicrobiana (LEMOS et al., 1992 apud PASCUAL et al., 2001); atividade antioxidante para o extrato metanólico das partes aéreas e do caule (DAVID et al., 2007); atividade relaxante em aorta e traqueia de rato e potencial atividade gastrointestinal para o extrato etanólico das partes aéreas (ANTUNES et al., 2011; JACINTO et al., 2011), atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* (XAVIER, 2011) e mais recentemente, atividade espasmolítica em traqueia (OLIVEIRA et al., 2012) e íleo de cobaia (OLIVEIRA, 2013) para o óleo essencial das folhas.

2.4 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos complexos, naturais e voláteis, lípidos, raramente coloridos, caracterizados por um forte odor e são produzidos por plantas aromáticas como metabólitos secundários. Eles podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta como broto, flor, folha, caule, ramo, semente, fruto, raiz e casca, sendo armazenados em células secretoras, canais ou células da epiderme (BAKKALI et al., 2008).

É importante salientar que há variações na composição quanti e qualitativa destes produtos naturais a depender da composição química do solo (SANTOS et al., 2012), da fase de crescimento e maturação da planta (TAVARES et al., 2005), da sazonalidade da coleta (CERQUEIRA et al., 2009), da temperatura do ar de secagem do material vegetal (RADÜNZ et al., 2002), dentre outras variáveis.

Os óleos essenciais têm baixo peso molecular e são compostos por dois grupos de origem biossintética distinta: o principal grupo é formado por terpenos e o outro é constituído por componentes alifáticos e aromáticos. A atividade biológica apresentada pelo óleo essencial, geralmente, é gerada pelo componente majoritário, entretanto o complexo não pode ser desprezado, uma vez que pode haver sinergismo entre as substâncias constituintes do óleo (BAKKALI et al., 2008).

No Brasil, esses compostos vêm sendo fontes de substâncias potencialmente aplicáveis com propriedades biológicas, farmacológicas ou terapêuticas com resultados promissores. Produtos a base de óleo essencial foram recentemente lançados no mercado, a exemplo do Acheflan[®] (*Cordia verbenacea* DC.), que contém α -humuleno, sendo indicado topicamente para o tratamento de tendinite crônica e de dores miofaciais, e do Rowachol[®], contendo borneol, α -pineno, cafeno, 1,8-cineol, mentona e mentol, e que cuja indicação é para combater cálculos biliares, como colerético e colagogo (HENRIQUE; SIMÕES-PIRES; APEL, 2009).

Foram descritas atividades espasmolíticas para muitos óleos essenciais, como por exemplo, os obtidos de: *Zingiber roseum* e *Satureja obovata* em duodeno de rato (CRUZ et al., 1990; PRAKASH et al., 2006), *Ocimum gratissimum* e espécies do gênero *Pelargoniums* (Geraniaceae) em íleo de cobaia (LIS-BALCHIN; HART; ROTH, 1997; MAGALHÃES; LAHLOU; LEAL-CARDOSO, 2004; MADEIRA et al., 2005), *Pterodon polygalaeflorus* em traqueia de rato (EVANGELISTA et al., 2007) *Casimiroa pringlei* em útero de rata (ZAVALA et al., 2008) e *Xylopia langsdorfiana* A.

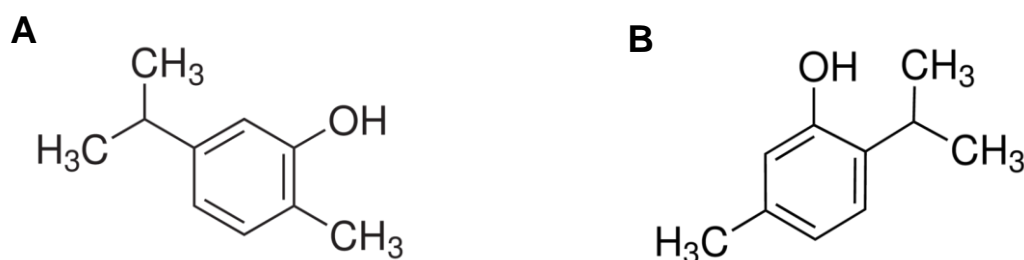
St.-Hil. & Tul., *Xylopi frutescens* Aubl. e *Rollinia leptopetala* R. E. Fries em vários modelos de músculo liso (CORREIA, 2013).

Já para o óleo essencial extraído das folhas da espécie *L. microphylla* é relatado algumas atividades farmacológicas como antifúngica contra *Rhizoctonia solani* (SCHURT et al., 2012); bactericida contra *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*, onde o componente majoritário encontrado foi o 1,8-cineol (RODRIGUES et al., 2011); vasorrelaxante em artérias mesentérica e aorta de rato (ARAÚJO, 2011) e espasmolítica em traqueia (OLIVEIRA et al., 2012) e íleo de cobaia (OLIVEIRA, 2013).

De acordo com a revisão realizada por Pascual et al. (2001), os principais constituintes do óleo essencial de *L. microphylla* são os monoterpenos 1,8-cineol, α -terpineol, terpinen-4-ol, metiltimol, sabineno, γ -terpineno e timol e os sesquiterpenos β -cariofileno e α -humuleno. Para o presente trabalho, a alíquota em estudo apresenta uma variedade de constituintes, sendo os majoritários o carvacrol e o timol, que isoladamente apresentam um teor de aproximadamente 32% para o carvacrol e 46% para o timol, e quando em conjunto somam quase 80% do total do óleo (Anexos 1 e 2).

Estes dois constituintes são isômeros de posição, sendo o carvacrol conhecido quimicamente como 5-metil-2-(1-metiletil)-fenol e o timol como 5-isopropil-2-metilfenol, possuem fórmula molecular $C_{10}H_{14}O$ e massa molar de 150,2 g/mol (Figura 2) (www.sigmaaldrich.com).

Figura 2 – Estrutura química do carvacrol (A) e do timol (B).



Fonte: www.sigmaaldrich.com
(acessado em: 23 de agosto de 2013)

As atividades biológicas e farmacológicas descritas pela literatura para o carvacrol incluem: inseticida contra moscas domésticas através do antagonismo dos receptores nicotínicos da acetilcolina (TONG et al., 2012), anti-inflamatória por

redução de mediadores da inflamação e possível indução de mediadores anti-inflamatórios (LIMA et al., 2013), antinociceptiva (CAVALCANTE MELO et al., 2012), redução da excitabilidade neuronal por bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem (JOCA et al., 2012), vasorrelaxante em aorta torácica de rato (PEIXOTO-NEVES et al., 2010) e espasmolítica em íleo de cobaia (OLIVEIRA, 2013).

Da mesma forma, é relatado para o timol algumas atividades farmacológicas como antimicrobiana de amplo espectro (DORMAN; DEANS, 2000; LAMBERT et al., 2001 apud ARAÚJO, 2011), redução da atividade contrátil do tônus espontâneo do músculo liso estomacal e da veia porta de cobaias (BEER; LUKANOV; SAGORCHEV, 2007), espasmolítica em íleo e traqueia de ratos e aumento do transporte mucociliar em camundongos (BEGROW et al., 2010), vasorrelaxante em artérias aorta e mesentérica de ratos por bloqueio do influxo de Ca^{2+} através de canais de cálcio (PEIXOTO-NEVES et al., 2010; ARAÚJO, 2011) e espasmolítica em íleo de cobaia (OLIVEIRA, 2013).

2.5 Regulação da contração e do relaxamento do músculo liso

Os produtos naturais são substâncias com atividades potencialmente terapêuticas sobre o músculo liso que é o principal tipo de músculo controlador da maioria dos sistemas de órgãos ocos do corpo, como vasos sanguíneos, estômago, intestinos, bexiga e vias aéreas. Sabendo-se dessa importância, há um grande interesse em se investigar produtos com ação espasmolítica, que são aqueles que reduzem o tônus dos músculos lisos inibindo a sua contração ou induzindo o seu relaxamento. A regulação/desregulação da contração do músculo liso desempenha um papel essencial em muitos processos fisiopatológicos, sendo o íon Ca^{2+} mediador de grande parte desses processos e das ações dos fármacos no organismo humano (WEBB, 2003).

Nesse sentido, o interesse em investigar óleos essenciais ou seus componentes majoritários com atividade sobre a musculatura lisa reside no fato de que substâncias com atividade espasmolítica têm uma vasta aplicação em vários processos fisiopatológicos, tais como: hipertensão, asma, arritmias cardíacas, diarreias, cólicas intestinais e uterinas e disfunção erétil (KIM et al., 2008). Além disso, como os mecanismos de contração e de relaxamento muscular envolvem

mobilizações de íons Ca^{2+} e este íon medeia grande parte das ações de substâncias no nosso organismo, o modelo do músculo liso se apresenta como meio relativamente simples e eficaz para se investigar mecanismos de ação de produtos que envolvem a sinalização intracelular do cálcio (WEBB, 2003).

Na busca por substâncias que interfiram na sinalização intracelular do Ca^{2+} , o músculo liso se tornou uma alternativa para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem essa investigação (KARAKI et al., 1997). Como um segundo mensageiro importante, o Ca^{2+} desempenha um papel essencial em uma grande variedade de processos biológicos, incluindo a regulação enzimática, a expressão gênica, o tráfego de proteína, a proliferação celular, a apoptose e a coordenação do acoplamento excitação-contração dos músculos esquelético, cardíaco e liso (CARAFOLI; BRINI, 2007). Em geral, existem duas fontes deste íon sinalizador na célula: uma extracelular que permite o influxo de Ca^{2+} para o citoplasma, através dos canais na membrana plasmática e outra intracelular representada pelos estoques internos, principalmente pelo retículo sarcoplasmático (RS) que libera Ca^{2+} para o citosol (MA; PAN, 2003).

A porta principal para a entrada do Ca^{2+} extracelular são os canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) (CATTERALL, 2000) presentes na membrana celular da maioria das células excitáveis (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). A entrada do cálcio no músculo liso visceral é controlada pelo potencial de membrana, uma vez que este determina a abertura dos Ca_v (SHMIGOL; EISNER; WRAY, 1998; WRAY et al., 2001).

O espasmo é caracterizado por uma contração muscular e este efeito pode ser revertido quando se impede alguma etapa do processo contrátil. O mecanismo de contração é predominantemente resultante de um aumento da concentração de cálcio citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) que pode ser de origem externa, através de mudança no potencial de membrana e/ou indiretamente pela ligação dos agonistas aos seus receptores levando à abertura de canais de Ca^{2+} do tipo L ($\text{Ca}_v\text{-L}$) (CASTEELS; SUZUKI, 1980; NEILD; KOTECHA, 1987; NELSON; STANDEN; WORLEY, 1988).

Este aumento no conteúdo citosólico de Ca^{2+} promove contração e também está envolvido na proliferação celular do músculo liso (HILL-EUBANKS et al., 2011). A regulação funcional da $[\text{Ca}^{2+}]_c$, para dar início a uma resposta contrátil no músculo liso depende de dois estímulos que levam a dois tipos de acoplamentos: o acoplamento eletromecânico, que está envolvido com a mudança do potencial de

membrana (V_m) e o acoplamento fármaco-mecânico, que acontece quando a contração promovida por um agonista é maior que a observada só com a mudança do V_m (REMBOLD, 1992).

O acoplamento eletromecânico promove a resposta contrátil devido a uma despolarização de membrana diretamente associada ao aumento da concentração extracelular de potássio ($[K^+]_e$) ou indiretamente pela ligação dos agonistas aos seus receptores levando à abertura de Ca_v na membrana plasmática, causando um aumento de Ca^{2+} citosólico e, conseqüentemente, a contração (REMBOLD, 1996).

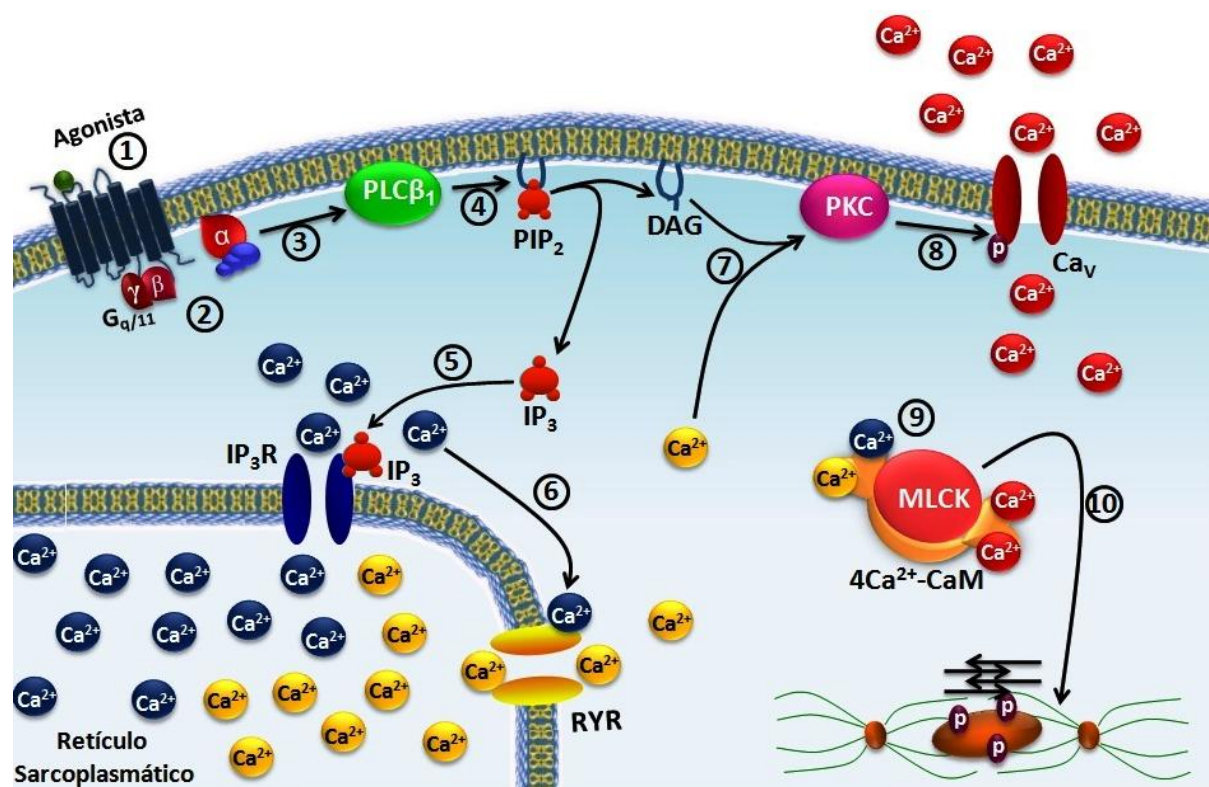
A família dos canais de Ca^{2+} possui 10 tipos de Ca_v , classificados segundo sua sequência primária de aminoácidos e suas funções fisiológicas, subdivididos em três subfamílias: 1) Ca_v1 ou Ca_v-L ($Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ e $Ca_v1.4$) – sensíveis à di-hidropiridinas, ativados por alta voltagem e os principais envolvidos no acoplamento excitação-contração; 2) Ca_v2 ou Ca_v-P/Q ($Ca_v2.1$); Ca_v-N ($Ca_v2.2$); Ca_v-R ($Ca_v2.3$) – insensíveis à di-hidropiridinas, sensíveis à alta voltagem e à toxinas de aranha e caramujo marinho (ω -agatoxina, ω -conotoxin e SNX-482), são expressos principalmente em neurônios; 3) Ca_v3 ou Ca_v-T ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ e $Ca_v3.3$) – ativados por baixa voltagem, insensíveis à di-hidropiridinas e às toxinas de aranha e caramujo marinho, são transitórios e expressos em vários tipos celulares, onde estão envolvidos na formação do potencial de ação com padrões repetitivos (CATTERALL, 2011).

A subfamília dos Ca_v1 , que são alvos de bloqueadores de canais de Ca^{2+} usados na terapêutica (nifedipino e verapamil), é amplamente expressa nas células musculares cardíacas e lisas (WATERMAN, 2000).

O acoplamento fármaco-mecânico da contração (Figura 3) ocorre quando um agonista como carbacol ou ocitocina, se liga a seus respectivos receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e ativa a cascata do inositol, através da proteína G_q ou G_{11} , cuja subunidade α ativa a fosfolipase C β_1 ($PLC\beta_1$) e, conseqüentemente, promove a hidrólise de fosfolipídios presentes na membrana do tipo 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP_2), formando o 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) e o diacilglicerol (DAG) (BILLINGTON; PENN, 2003; BERRIDGE, 2008). O IP_3 estimula a liberação de Ca^{2+} do RS (principal fonte de Ca^{2+} intracelular) por sua ligação aos receptores de IP_3 (IP_3R), que são canais de Ca^{2+} ativados pelo IP_3 . Além disso, no RS há os receptores de rianodina (RyR), que são canais de Ca^{2+} ativados pelo próprio Ca^{2+} e são sensíveis à cafeína. O Ca^{2+} previamente liberado via IP_3R ativa o RyR num

processo denominado de liberação de Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} (CICR). Ambos os receptores permitem a liberação de Ca^{2+} do RS para o citosol aumentando a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (DELLIS et al., 2006; MCHALE et al., 2006). A liberação de Ca^{2+} do RS induz a translocação da proteína cinase C (PKC) para a membrana plasmática, onde esta é ativada pelo DAG. Várias isoformas de PKC já foram encontradas no músculo liso, onde a ativação dessas cinases leva a fosforilação de proteínas-alvo específicas, como os Ca_v presentes na membrana plasmática ativando-os, promovendo o influxo de Ca^{2+} (BERRIDGE, 2009a).

Figura 3 – Esquema do mecanismo fármaco-mecânico da contração no músculo liso pela ativação da via $\text{G}_{q/11}$ - $\text{PLC}\beta_1$.



Fonte: Adaptado de CORREIA, 2013.

1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; 2) As proteínas $\text{G}_{q/11}$ trocam GDP por GTP na sua subunidade α (não mostrado na figura), tornando-se ativas; 3) A subunidade $\alpha_{q/11}$ -GTP ativa a enzima $\text{PLC}\beta_1$; 4) A $\text{PLC}\beta_1$ cliva o lipídio de membrana PIP_2 em IP_3 e DAG; 5) O IP_3 migra pelo citoplasma e ativa o IP_3R presente na membrana do RS, liberando o Ca^{2+} dos estoques; 6) O Ca^{2+} liberado ativa o RyR , fazendo com que mais Ca^{2+} seja liberado para o citoplasma; 7) O Ca^{2+} que foi liberado, juntamente com o DAG ativam a PKC; 8) A PKC ativada fosforila os Ca_v1 promovendo o influxo de Ca^{2+} através dos mesmos; 9) O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ aumenta a afinidade pela CaM formando o complexo 4Ca^{2+} -CaM e ativa a MLCK; 10) A MLCK ativada fosforila a MLC que interage com os filamentos da actina, desencadeando a contração do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

O Ca^{2+} quando em quantidades elevadas no meio citoplasmático liga-se a CaM formando o complexo 4Ca^{2+} -CaM que ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK). O complexo 4Ca^{2+} -CaM-MLCK constitui a forma ativa da MLCK, que tem como função fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC) e esta fosforilação permite o desencadeamento do mecanismo de ciclicização das pontes cruzadas entre os filamentos da actina e da miosina favorecendo um deslizamento entre estes filamentos, com o consequente desenvolvimento da contração (SOMLYO; SOMLYO, 1994 e 2003).

Se o aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_c$ gera a contração muscular, consequentemente o relaxamento ocorre, em parte, por diminuição dos níveis deste íon no meio citosólico (SOMLYO; SOMLYO, 1994). Esta diminuição na $[\text{Ca}^{2+}]_c$ pode ocorrer por um mecanismo eletromecânico, caracterizado pela repolarização ou pela hiperpolarização da membrana, ou ainda, pelo mecanismo fármaco-mecânico, que se dá pela ativação de receptores de membrana e inibição das vias bioquímicas que levam a contração (WOODRUM; BROPHY, 2001).

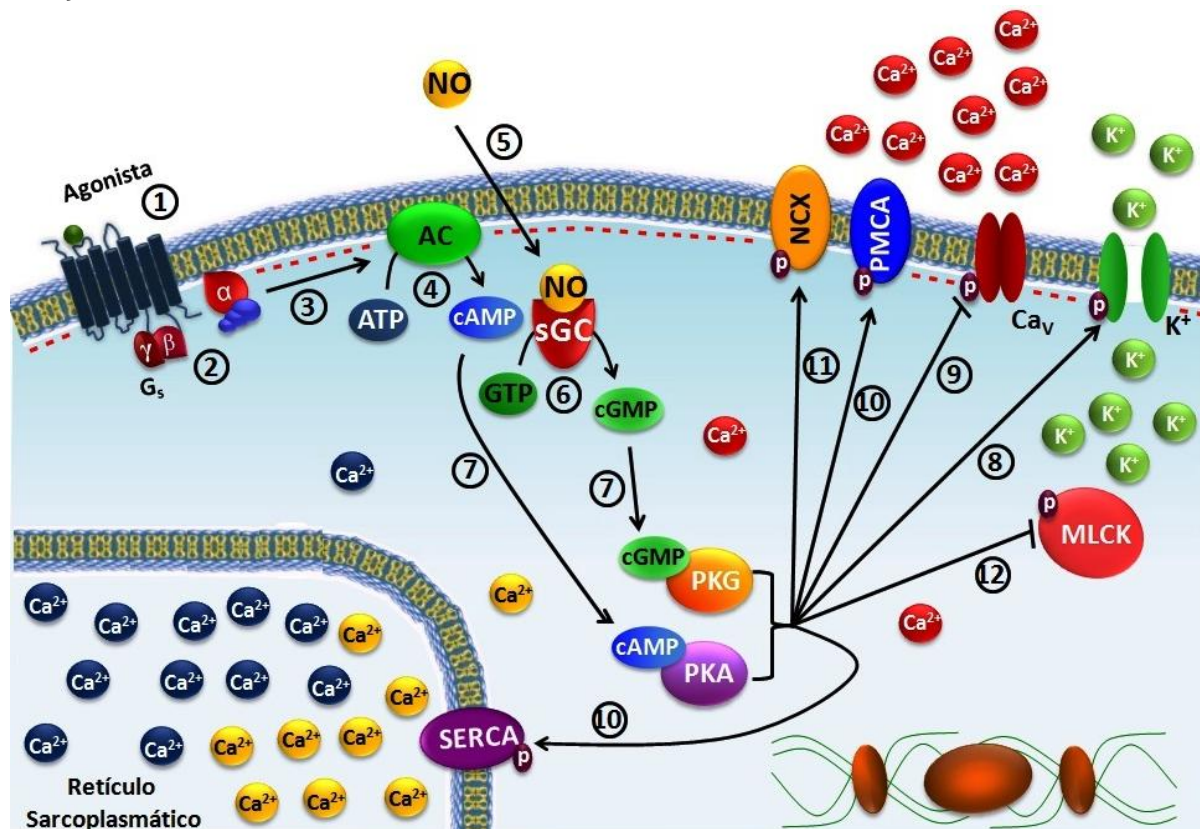
O acoplamento eletromecânico envolve a abertura de canais de K^+ , que desempenham um papel chave na regulação do potencial de repouso da membrana e na excitabilidade celular, sendo que a contração no músculo liso depende do balanço entre o aumento da condutância ao K^+ , gerando uma repolarização/hiperpolarização, e a diminuição de sua condutância que gera uma despolarização (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996). Os canais de K^+ conduzem íons K^+ através da membrana plasmática a favor do seu gradiente eletroquímico, ou seja, do meio intra para o meio extracelular (MACKINNON, 2003), mantendo o potencial de membrana das células no estado de repouso próximo ao do potencial de equilíbrio do K^+ (cerca de -90 mV) (VOGALIS, 2000). A atividade desses canais pode ser regulada por voltagem, por Ca^{2+} ou por neurotransmissores, e pelas vias de sinalização que os estimulam (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011).

O acoplamento fármaco-mecânico promove o relaxamento do músculo liso (Figura 4) via GPCR acoplado à proteína G_s , cuja subunidade α ativa a ciclase de adenilil (AC) que converte o trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). Além disso, a geração de óxido nítrico (NO) tanto dos nervos como das células musculares lisas, estimula a atividade da ciclase de guanilil solúvel (sGC) que induz a formação de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) (MURTHY, 2006). O aumento nos níveis citosólicos de cAMP e cGMP nas células

musculares lisas é considerado um dos mais importantes mecanismos que medeiam seu relaxamento sob condições fisiológicas (PUETZ; LUBOMIROV; PFITZER, 2009).

O cAMP e o cGMP (em baixas concentrações) ativam seletivamente as proteínas cinases dependentes de cAMP (PKA) e de cGMP (PKG), respectivamente. Entretanto, quando as concentrações citoplasmáticas de cAMP estão elevadas pode haver ativação cruzada da proteína cinase e, consequentemente, cAMP ativa a PKG. Além disso, a ativação da PKG pelo cGMP gradualmente aumenta a afinidade do cAMP pela PKG (MURTHY, 2006).

Figura 4 – Esquema do mecanismo fármaco-mecânico do relaxamento no músculo liso pela ativação da via G_s -AC-PKA e NO-sGC-PKG.



Fonte: Adaptado de CORREIA, 2013.

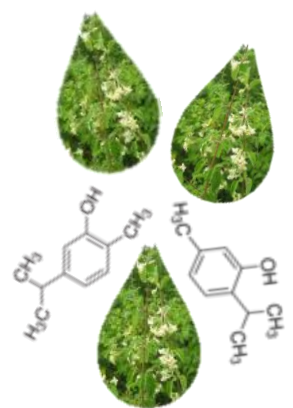
1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; 2) A proteína G_s troca GDP por GTP na sua subunidade α (não mostrado na figura), tornando-se ativa; 3) A subunidade α_s -GTP ativa a AC; 4) A AC converte o ATP em cAMP; 5) O NO gerado tanto dos nervos como das células musculares lisas, estimula a atividade da sGC; 6) A sGC converte o GTP em cGMP; 7) Os nucleotídeos cíclicos, cAMP e cGMP ativam suas respectivas proteínas cinases, PKA e PKG. Ambas as proteínas cinases fosforilam vários substratos: 8) Ativam os canais de K^+ ; 9) Inibem os Ca_v ; 10) Aumentam a atividade da SERCA e da PMCA; 11) Ativam o trocador Na^+/Ca^{2+} ; Todos esses mecanismos diminuem a $[Ca^{2+}]_c$ e 12) Inibem a MLCK, reduzindo sua afinidade pelo $4Ca^{2+}$ -CaM impedindo a ativação da MLC e, consequentemente, sua interação com os filamentos da actina, promovendo o relaxamento do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Assim, ambas as proteínas cinases fosforilam vários substratos, levando a: 1) ativação de canais de K^+ , que indiretamente, por repolarização ou hiperpolarização, causam a desativação dos Ca_v ; 2) inibição dos Ca_v , causando uma redução da $[Ca^{2+}]_c$ por diminuir o influxo de Ca^{2+} (REMBOLD, 1996; MAKHLOUF; MURTHY, 1997); 3) um aumento na atividade da Ca^{2+} -ATPase tanto do RS (SERCA) como da membrana plasmática (PMCA), aumentando assim o sequestro e a extrusão de Ca^{2+} , respectivamente, diminuindo a $[Ca^{2+}]_c$; 4) diminuição da $[Ca^{2+}]_c$ por ativação do trocador Na^+/Ca^{2+} (BLAUSTEIN, 1989) e 5) inibição da MLCK, reduzindo sua afinidade pelo $4Ca^{2+}$ -CaM, impedindo a fosforilação da MLC e, conseqüentemente, do processo contrátil (REMBOLD, 1992).

Os mecanismos envolvidos no trabalho de parto prematuro ainda não estão totalmente esclarecidos. Podem estar associados com a ativação prematura do processo fisiológico de contração ou com um fator patológico responsável pelas contrações uterinas, o que levaria a um parto prematuro. A contratilidade do miométrio é um processo complexo, baseado no funcionamento dos miócitos e envolve a presença de receptores hormonais e canais de íons. Sendo assim, um aumento na concentração de cálcio intracelular é essencial para a contração do músculo liso uterino (HUBINONT; DEBIEVE, 2011).

Alguns fármacos tocolíticos já estão disponíveis há décadas, mas suas ações são dirigidas para os efeitos e não para as causas do trabalho de parto prematuro. Suas eficácias dependem de um diagnóstico precoce e preciso da doença através do teste positivo da fibronectina fetal e de ultrassonografia do colo uterino. Entre as classes utilizadas para prevenir o trabalho de parto prematuro podemos citar: antagonistas dos receptores de ocitocina (atosibano), agonistas dos receptores adrenérgicos β_2 (ritodrina) e bloqueadores dos canais de cálcio (nifedipino) (HUBINONT; DEBIEVE, 2011).

É fato que já se têm muitos medicamentos espasmolíticos na terapêutica, porém a relevância deste estudo reside na utilização da musculatura lisa uterina como modelo animal e da utilização do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham., assim como dos seus constituintes majoritários carvacrol e timol, visto que a literatura não relata atividades desses produtos no referido órgão e que os mesmos compostos apresentam atividade espasmolítica em outros modelos animais (BEGROW et al., 2010; PEIXOTO-NEVES et al., 2010; ARAÚJO, 2011; OLIVEIRA, 2013), tendo a finalidade de ampliar a utilização dessa espécie.



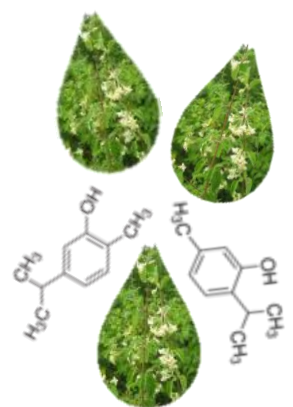
3 Objetivos

3.1 GERAIS

- Contribuir para o estudo farmacológico da família Verbenaceae, em particular da espécie *Lippia microphylla* Cham. com a finalidade de descobrir drogas com potencial terapêutico tocolítico ou que atuem como ferramentas farmacológicas.
- Investigar e comparar o efeito tocolítico do óleo essencial das folhas de *L. microphylla* (LM-OE) com o de seus constituintes majoritários isolados, carvacrol e timol, bem como da mistura timol-carvacrol, através de estudos funcionais.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito tocolítico do LM-OE, do carvacrol, do timol e da mistura timol-carvacrol frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou por ocitocina em útero isolado de rata;
- Investigar o mecanismo de ação tocolítica do produto-teste que apresentar maior eficácia e/ou potência farmacológicas:
 - Avaliar o efeito relaxante do produto-teste sobre o componente tônico;
 - Avaliar a participação dos Ca_v no efeito tocolítico do produto-teste;
 - Avaliar a participação dos canais de potássio no efeito tocolítico do produto-teste.



4 Material e Métodos

4.1 MATERIAL

4.1.1 Material Botânico

A espécie *Lippia microphylla* Cham. foi coletada no município de Serra Branca, estado da Paraíba. O material botânico foi identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, do setor de Botânica do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), do Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Uma exsicata da planta está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), da UFPB sob código de identificação AGRA et al., 6118.

4.1.2 Produtos-teste

Foi utilizado o óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (LM-OE), que foi obtido de suas folhas, caracterizado por José Guilherme S. Maia e por Eloisa Helena A. Andrade da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal do Pará (Anexos 1 e 2) e gentilmente cedido pela equipe do Prof. Dr. Josean Fachine Tavares do setor de Fitoquímica do PPgPNSB/CCS/UFPB. Também foram utilizados os constituintes majoritários do óleo, carvacrol e timol, obtidos da Sigma-Aldrich (Brasil) com pureza igual ou superior a 99,5%.

4.1.3 Animais

Eram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) virgens pesando entre 150-250 g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Centro de Biotecnologia (CBiotec)/UFPB.

Antes dos experimentos os animais eram mantidos sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Labina[®]) com livre acesso a água, com ventilação e temperatura (21 ± 1 °C) controladas e constantes, submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 horas, sendo o período claro das 06 às 18 horas. Os experimentos eram realizados entre 08 e 20 horas no Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas do PPgPNSB/CCS/UFPB. Todos os procedimentos experimentais foram realizados

seguindo os princípios de cuidados com animais submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (Certidão Nº 1005/13) do CBIotec (Anexo 3).

4.1.4 Drogas e Reagentes

O cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o bicarbonato de sódio (NaHCO_3), o cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) foram adquiridos da Vetec (Brasil). O cloreto de sódio (NaCl) e o cloreto de potássio (KCl) foram adquiridos da Química Moderna (Brasil). Estas substâncias, exceto a $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, o NaCl e o NaHCO_3 , eram dissolvidas e diluídas em água destilada para obtenção de cada solução-estoque que foram mantidas sob refrigeração.

O cloridrato de carbamilcolina (CCh) e a ocitocina foram obtidos da Merck (Brasil) e da União Química (Brasil), respectivamente, e mantidos em um “freezer”. Ambos eram dissolvidos e diluídos em água destilada para obtenção das soluções-estoque (10^{-2} M e 10^{-2} UI/mL, respectivamente) que eram mantidas a 0 °C em refrigerador. A solução-estoque de CCh era diluída em água destilada para obtenção de concentrações apropriadas a cada protocolo experimental.

O óleo de castor (Cremophor®), o 1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]3-piridina carboxílico ácido metil éster (S-(-)-Bay K8644), o cloreto de cério (CsCl) e o dietilestilbestrol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Estas substâncias, exceto o Cremophor® eram mantidas em um “freezer” à temperatura de -20 °C. O S-(-)-Bay K8644 e o CsCl eram dissolvidos em água destilada e o dietilestilbestrol em álcool etílico absoluto.

O ácido clorídrico P.A. (HCl) foi obtido da Nuclear (Brasil), o hidróxido de sódio (NaOH) e o álcool etílico absoluto foram obtidos da Fmaia (Brasil). A mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) foi adquirida da White Martins (Brasil).

4.1.5 Soluções nutritivas

O pH das soluções nutritivas, cujas composições estão descritas a seguir, era ajustado para 7,4 com HCl ou NaOH 1N.

Locke Ringer (mM) – NaCl (154,0); KCl (5,6); CaCl₂ (2,2); MgCl₂ (2,1); C₆H₁₂O₆ (5,6); NaHCO₃ (6,0) (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997).

Locke Ringer nominalmente sem Ca²⁺ (mM) – NaCl (154,0); KCl (5,6); MgCl₂ (2,1); C₆H₁₂O₆ (5,6); NaHCO₃ (6,0) (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997).

4.1.6 Preparo das soluções dos produtos-teste

4.1.6.1 Preparo da solução do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham.

O LM-OE era solubilizado em Cremophor[®] (3% v/v) e diluído em água destilada para obtenção da solução de partida (10 mg/mL). Esta solução era feita diariamente antes de cada experimento, uma vez que os óleos essenciais caracterizam-se pela presença de compostos voláteis. De acordo com a necessidade de cada protocolo experimental a solução era novamente diluída em água destilada. A concentração final de Cremophor[®] nas cubas nunca excedeu 0,01% (v/v). Nesta concentração, o mesmo é desprovido de efeito contrátil ou relaxante significativo no órgão estudado, de acordo com dados obtidos em experimentos anteriores.

As concentrações do LM-OE eram utilizadas em múltiplos de 3 a fim de se obter as concentrações que produzissem de 0 a 100% do seu efeito.

4.1.6.2 Preparo das soluções-estoque do carvacrol, do timol e da mistura timol-carvacrol

Assim como o LM-OE, o carvacrol e o timol eram solubilizados em Cremophor[®] (3% v/v) e diluídos em água destilada para obtenção das suas soluções de partida (10⁻² M). Já a solução da mistura timol-carvacrol (1,46:1) era preparada de acordo com as concentrações em que o carvacrol (31,74%) e o timol (46,52%) se encontram no LM-OE. O cálculo era feito a partir de uma regra de três simples, onde a soma das percentagens individuais dos constituintes no óleo era considerada 100% e a percentagem de cada um “x”. Dessa forma, para a preparação de 1 mL da solução-estoque da mistura timol-carvacrol 10⁻² M eram utilizados 405 µL da solução 10⁻² M de carvacrol e 595 µL da solução 10⁻² M de timol.

A concentração final de Cremophor® nas cubas nunca excedeu 0,01% (v/v). As concentrações de 3×10^{-5} e 10^{-4} M eram utilizadas como concentrações-teste para avaliar o efeito do carvacrol, do timol e da mistura timol-carvacrol. Se na concentração de 3×10^{-5} M o efeito relaxante fosse superior a 50% e na concentração de 10^{-4} M este efeito atingisse mais que 75%, as concentrações eram reduzidas a fim de encontrar aquela que produzisse o zero de efeito farmacológico.

4.1.7 Aparelhos

Para o registro das contrações isotônicas, o útero era suspenso em cubas de banho para órgãos isolados de 5 mL e conectados a uma alavanca isotônica de inscrição frontal a cilindros esfumaçados de um quimógrafo DTF (São Paulo, SP, Brasil). As cubas estavam acopladas a uma bomba termostática modelo Polystat 12002 Cole-Palmer (Vernon Hills, IL, EUA) para controle da temperatura.

As contrações isométricas eram registradas, com o útero suspenso em cubas de banho para órgãos isolados de 6 mL modelo BOI-04 e conectados a transdutores de força isométricos modelo TIM 05 acoplados a um amplificador modelo AECAD04F. Este por sua vez estava conectado a um sistema digital com os softwares AQCAD versão 2.3.7, para aquisição dos dados, e ANCAD para análise. O sistema continha uma bomba termostática modelo BT-60 que controlava a temperatura das cubas. Todos os aparelhos foram adquiridos da AVS Projetos (São Paulo, SP, Brasil).

Os valores de pH eram aferidos através de um pHmetro digital modelo PG2000 versão 4.3 (GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil).

As substâncias eram pesadas em balança analítica modelo AG 200 e os animais em balanças semianalíticas modelos BG 4000 e BG 4001 (GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Investigação do efeito tocolítico do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. e dos seus constituintes majoritários carvacrol e timol

4.2.1.1 Efeito do LM-OE, do carvacrol, do timol e da mistura timol-carvacrol frente às contrações fásicas induzidas por CCh ou por ocitocina em útero isolado de rata

As ratas eram tratadas 24 horas antes com dietilestilbestrol (1 mg/kg) por via subcutânea para indução do estro. Decorrido este tempo, eram eutanasiadas por deslocamento cervical seguido da secção dos vasos cervicais. A cavidade abdominal era aberta, o útero era retirado e colocado em um Becker contendo solução nutritiva de Locke Ringer sob aeração com carbogênio (Adaptado de REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997; MEDEIROS, 2006).

Em papel absorvente embebido em solução fisiológica, o útero era dissecado para retirada de todo o tecido conjuntivo e adiposo. Em seguida os dois cornos uterinos eram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente em cubas de banho para órgãos isolados, contendo solução nutritiva, aquecidas à 32 °C e aeradas com carbogênio. Estes tecidos eram mantidos sob tensão de 1 g e permaneceram em repouso por 40 minutos, tempo necessário para perfeita estabilização da preparação e durante este período a solução nutritiva era trocada a cada 10 minutos (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997).

Após o período de estabilização, era obtida uma contração isotônica com 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão e, após 15 minutos duas contrações isotônicas de magnitudes similares, com intervalo de 15 minutos entre ambas, eram obtidas com 10^{-5} M de CCh ou com 10^{-2} UI/mL de ocitocina (concentrações submáximas que produzem cerca de 80% da resposta máxima dos agonistas). O LM-OE, o carvacrol, o timol e a mistura timol-carvacrol eram incubados individualmente, por 5 minutos em preparações distintas e, na presença destes era induzida uma terceira contração por um dos agonistas acima citados.

A inibição da resposta contrátil ao CCh ou à ocitocina era avaliada por comparação das curvas-controle com a curva-resposta obtida após a adição dos

produtos. Os valores da concentração dos produtos-teste que inibem 50% do efeito máximo produzido por um agonista (CI_{50}) foram calculados por regressão não linear.

4.2.2 Investigação do mecanismo de ação tocolítica do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. em útero isolado de rata

4.2.2.1 Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina

O útero era montado como descrito no item anterior. Após o período de estabilização, uma contração submáxima era induzida por 60 mM de KCl ou por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e durante a fase tônica sustentada, o LM-OE era adicionado de maneira cumulativa à cuba em preparações diferentes.

O relaxamento era expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelos agentes contráteis. Os valores da concentração do LM-OE que produzem 50% do seu efeito máximo (CE_{50}) foram calculados por regressão não linear e expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) dos valores individuais da CE_{50} .

4.2.2.2 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) no efeito relaxante do LM-OE

4.2.2.2.1 Efeito tocolítico do LM-OE frente às contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca^{2+}

O útero era montado como descrito no item 4.2.1.1. Após um período de estabilização do útero por 30 minutos, a solução de Locke Ringer era substituída pela solução Locke Ringer nominalmente sem Ca^{2+} , que era mantida até o final do experimento. Depois de 30 minutos era adicionado 60 mM de KCl e após 10 minutos era induzida uma curva concentração-resposta cumulativa ao $CaCl_2$. A preparação era lavada com solução fisiológica e esperava-se o retorno a linha de base (em torno de 1 hora), após esse tempo era adicionado 60 mM de KCl por 10 minutos, em seguida o LM-OE era incubado por 15 minutos e na presença deste era obtida uma

segunda curva concentração-resposta cumulativa ao CaCl_2 (Adaptado de REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997).

Os resultados eram avaliados comparando-se a percentagem da resposta contrátil na presença do óleo essencial com aquela obtida pela amplitude máxima da curva-controle (100%) na ausência do LM-OE. O tipo de antagonismo exercido pelo LM-OE foi avaliado com base na análise dos valores de CE_{50} e do efeito máximo (E_{max}) do CaCl_2 calculado a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e na presença do óleo essencial.

4.2.2.2 Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644

O útero era montado como descrito no item 4.2.1.1. Após o período de estabilização em solução de Locke Ringer, o útero era parcialmente despolarizado pela adição de 15 mM de KCl por 10 minutos (CONTE-CAMERINO et al., 1987) e em sua presença era induzida uma contração por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (CALIXTO; RAE, 1991) um agonista seletivo dos Ca_v do tipo L ou Ca_v1 (SPEDDING; PAOLETTI, 1992). Durante a estabilização da fase tônica dessa contração o LM-OE era adicionado de maneira cumulativa. O relaxamento era expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelo S-(-)-Bay K8644. Os valores de CE_{50} foram calculados conforme descrito anteriormente.

4.2.2.3 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito relaxante do LM-OE

4.2.2.3.1 Efeito do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl

O útero era montado como descrito no item 4.2.1.1. Após o período de estabilização, era adicionado à cuba 5 mM de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de K^+ (LATORRE et al., 1989), após 20 minutos na presença do bloqueador era induzida uma contração por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sob o componente tônico dessa contração era adicionado o LM-OE de forma cumulativa. O relaxamento produzido pelo LM-OE era expresso como a percentagem reversa da contração

inicial induzida pelo agonista. Os valores de CE_{50} do óleo foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta na presença do bloqueador e comparados com os valores de CE_{50} do LM-OE na ausência do bloqueador.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados obtidos eram expressos como a média e o e.p.m., e analisados estatisticamente empregando-se o teste t não pareado ou análise de variância (ANOVA) “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni. A hipótese nula era rejeitada quando o valor de $p < 0,05$.

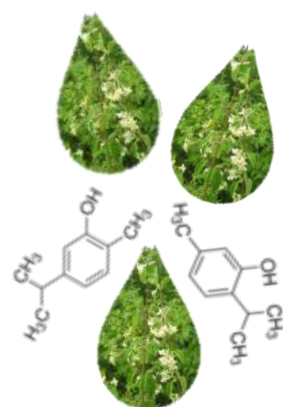
Os valores de CE_{50} , de CI_{50} (NEUBIG et al., 2003) e do coeficiente de correlação linear (R^2) foram calculados por regressão não linear para todos os experimentos realizados.

Para possibilitar a comparação dos valores de E_{max} entre o LM-OE e os constituintes majoritários isolados e em mistura converteram-se os valores de molar (M) para microgramas por mililitro ($\mu\text{g/mL}$) a partir da equação:

$$C = MM \times M \times 10^3$$

Onde: C é a concentração em $\mu\text{g/mL}$, MM é o peso molecular da substância, M é a concentração em molar e 10^3 é o fator de correção para esta equação, visto que sem ele C é expresso em g/L.

Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism[®] versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, E.U.A.).



5 Resultados

5.1 Investigação do efeito tocolítico do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. e dos seus constituintes majoritários carvacrol e timol

5.1.1 Efeito do LM-OE, do carvacrol, do timol e da mistura timol-carvacrol frente às contrações fásicas induzidas por CCh ou por ocitocina em útero isolado de rata

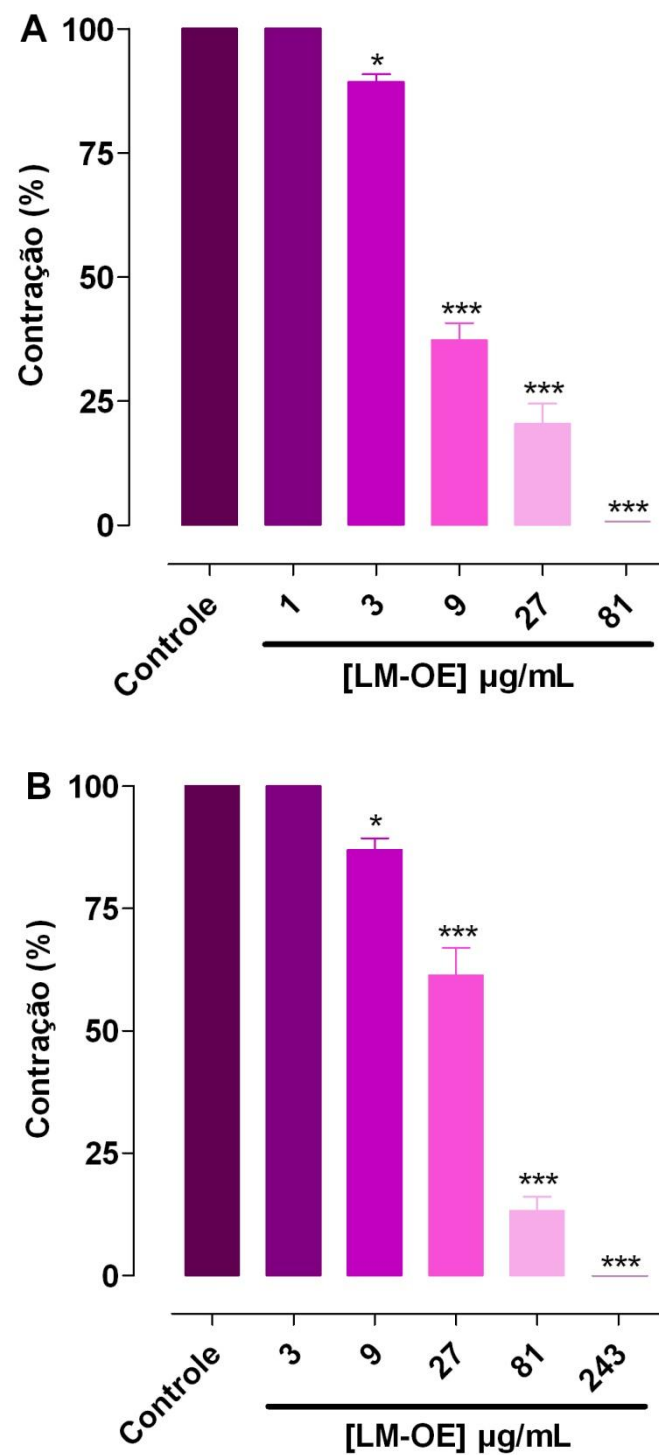
O LM-OE ($n = 5$) antagonizou, de maneira significativa e dependente de concentração, as contrações fásicas induzidas por 10^{-5} M de CCh (1-81 $\mu\text{g/mL}$) ou por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (3-243 $\mu\text{g/mL}$), sendo cerca de 4,5 vezes mais potente em inibir as contrações induzidas por CCh ($\text{CI}_{50} = 7,8 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$, $R^2 = 0,98 \pm 0,005$, Gráfico 1A) quando comparado com a ocitocina ($\text{CI}_{50} = 35,1 \pm 4,9 \mu\text{g/mL}$, $R^2 = 0,99 \pm 0,001$, Gráfico 1B). O óleo atingiu o E_{max} com a concentração de 81 e 243 $\mu\text{g/mL}$ frente aos agonistas CCh e ocitocina, respectivamente ($E_{\text{max}} = 100\%$) mostrando eficácia equivalente em relaxar o útero isolado de rata.

Enquanto que o carvacrol, o timol e a mistura timol-carvacrol (10^{-4} M, $n = 3$) antagonizaram as contrações fásicas induzidas por 10^{-5} M de CCh com baixa eficácia ($E_{\text{max}} = 41,4 \pm 10,3$; $35,4 \pm 8,3$ e $56,5 \pm 9,2\%$, Gráficos 2A, 3A e 4A, respectivamente). Já quando as contrações eram induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina, apenas o timol e a mistura timol-carvacrol apresentaram efeito inibitório ($E_{\text{max}} = 38,8 \pm 4,8$ e $69,8 \pm 2,4\%$, respectivamente) em útero de rata (Gráficos 2B, 3B e 4B).

Os constituintes majoritários isolados quando comparados entre si, e entre a mistura timol-carvacrol diferiram estatisticamente, apenas frente ao agonista ocitocina, sendo a mistura mais eficaz que os compostos isolados (Tabela 1).

O efeito inibitório produzido por todos os produtos testados foi revertido em até duas horas após a lavagem da preparação com solução fisiológica, sendo a reversão frente ao agonista ocitocina mais rápida (dados não mostrados).

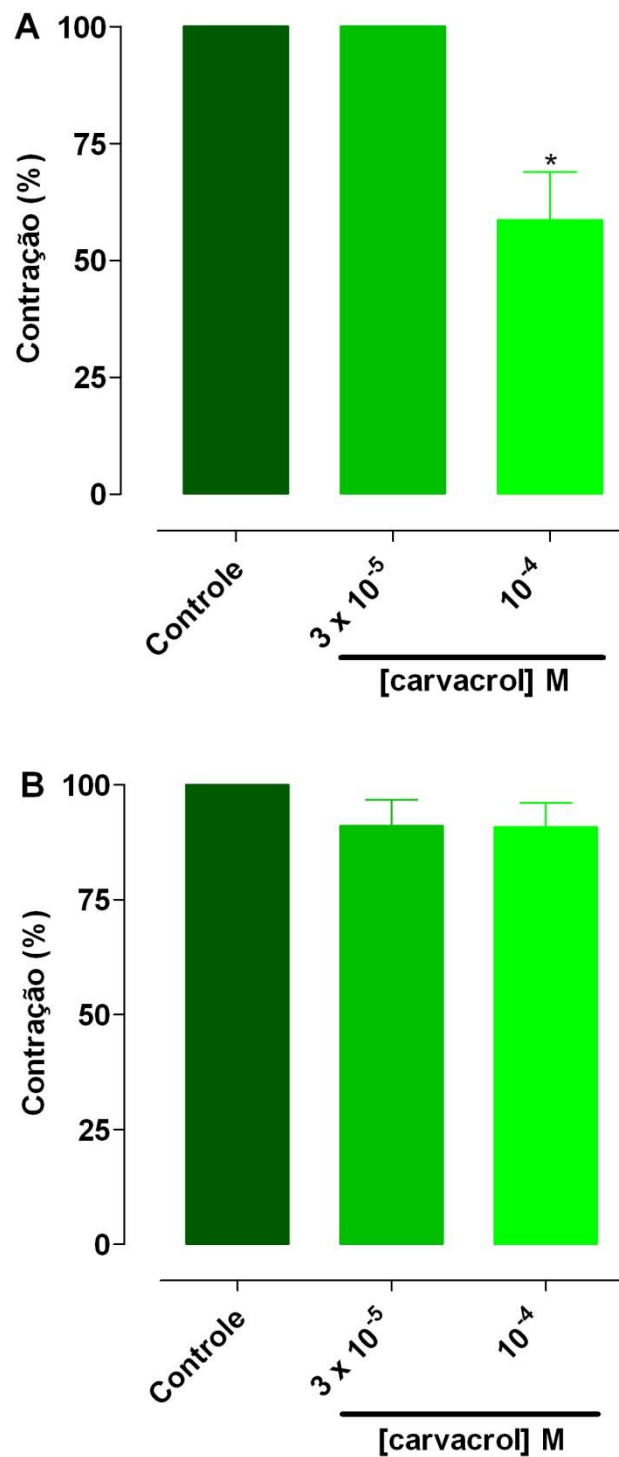
Gráfico 1 – Efeito relaxante do LM-OE frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-5} M de CCh (A) e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (B) em útero isolado de rata.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ (controle vs. LM-OE).

Fonte: Autor, 2013.

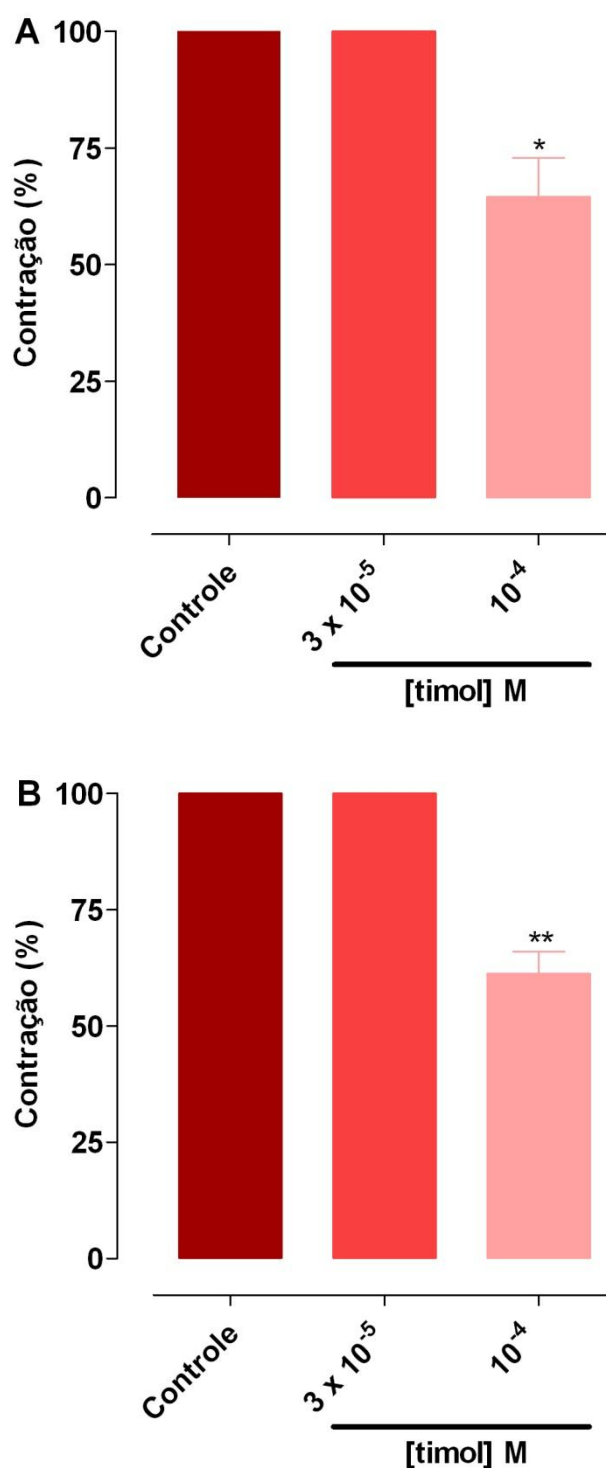
Gráfico 2 – Efeito relaxante do carvacrol frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-5} M de CCh (A) e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (B) em útero isolado de rata.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 3$). ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ (controle vs. carvacrol).

Fonte: Autor, 2013.

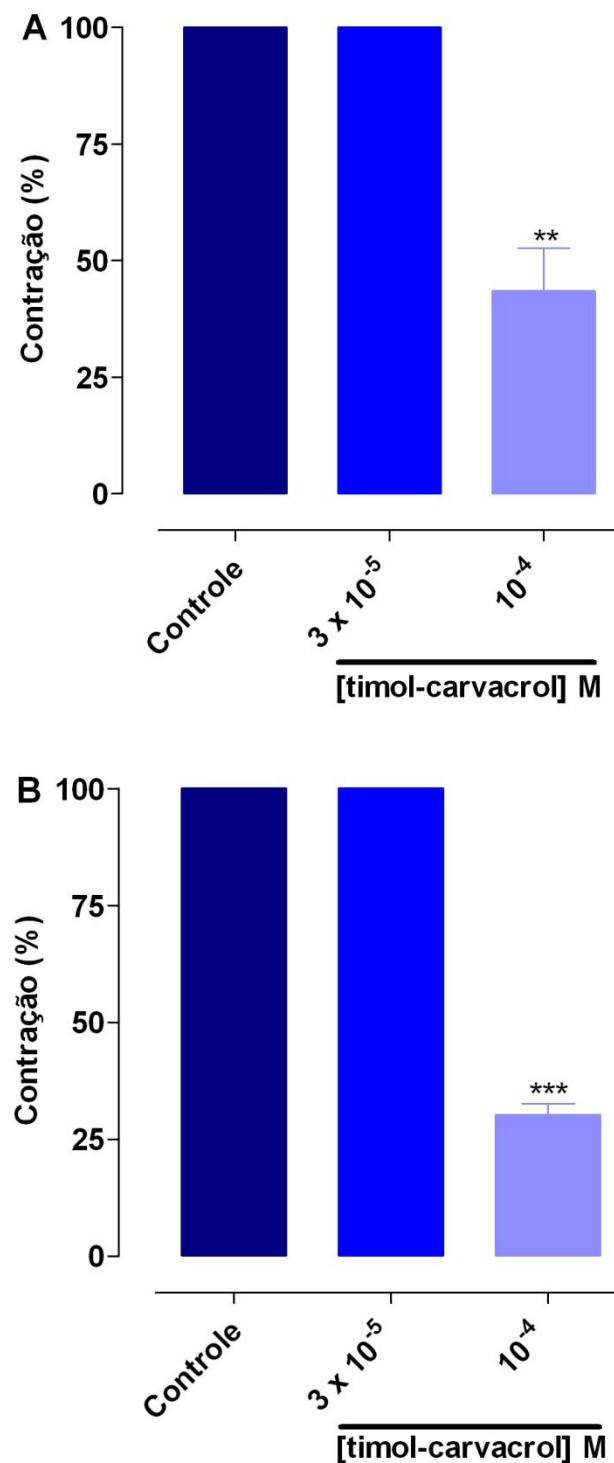
Gráfico 3 – Efeito relaxante do timol frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-5} M de CCh (A) e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (B) em útero isolado de rata.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 3$). ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (controle vs. timol).

Fonte: Autor, 2013.

Gráfico 4 – Efeito relaxante da mistura timol-carvacrol frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-5} M de CCh (**A**) e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (**B**) em útero isolado de rata.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 3$). ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (controle vs. timol-carvacrol).

Fonte: Autor, 2013.

Tabela 1 – Valores de E_{\max} (%) do LM-OE, do carvacrol, do timol e da mistura timol-carvacrol frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-5} M de CCh e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina em útero isolado de rata.

Produtos-teste	[µg/mL]	E_{\max} (%)		
		CCh (n)	[µg/mL]	OCI (n)
LM-OE	81	100 (5)	243	100 (5)
Carvacrol ¹	15	41,4 ± 10,3 (3)	15	9,2 ± 5,2 (3)
Timol ¹	15	35,4 ± 8,3 (3)	15	38,8 ± 4,8 (3) ^a
Timol-carvacrol (1,46:1) ¹	15	56,5 ± 9,2 (3)	15	69,8 ± 2,4 (3) ^{b,c}

¹A conversão dos valores da concentração dos constituintes majoritários isolados e em mistura de 10^{-4} M para 15 µg/mL foi feita de acordo com a equação $C = MM \times M \times 10^3$, descrita no item 4.3.

Teste t ; ^a $p < 0,05$ [carvacrol (OCI) vs. timol (OCI)]; ^b $p < 0,001$ [carvacrol (OCI) vs. timol-carvacrol (OCI)]; ^c $p < 0,01$ [timol (OCI) vs. timol-carvacrol (OCI)]; n = número de experimentos (animais).

Fonte: Autor, 2013.

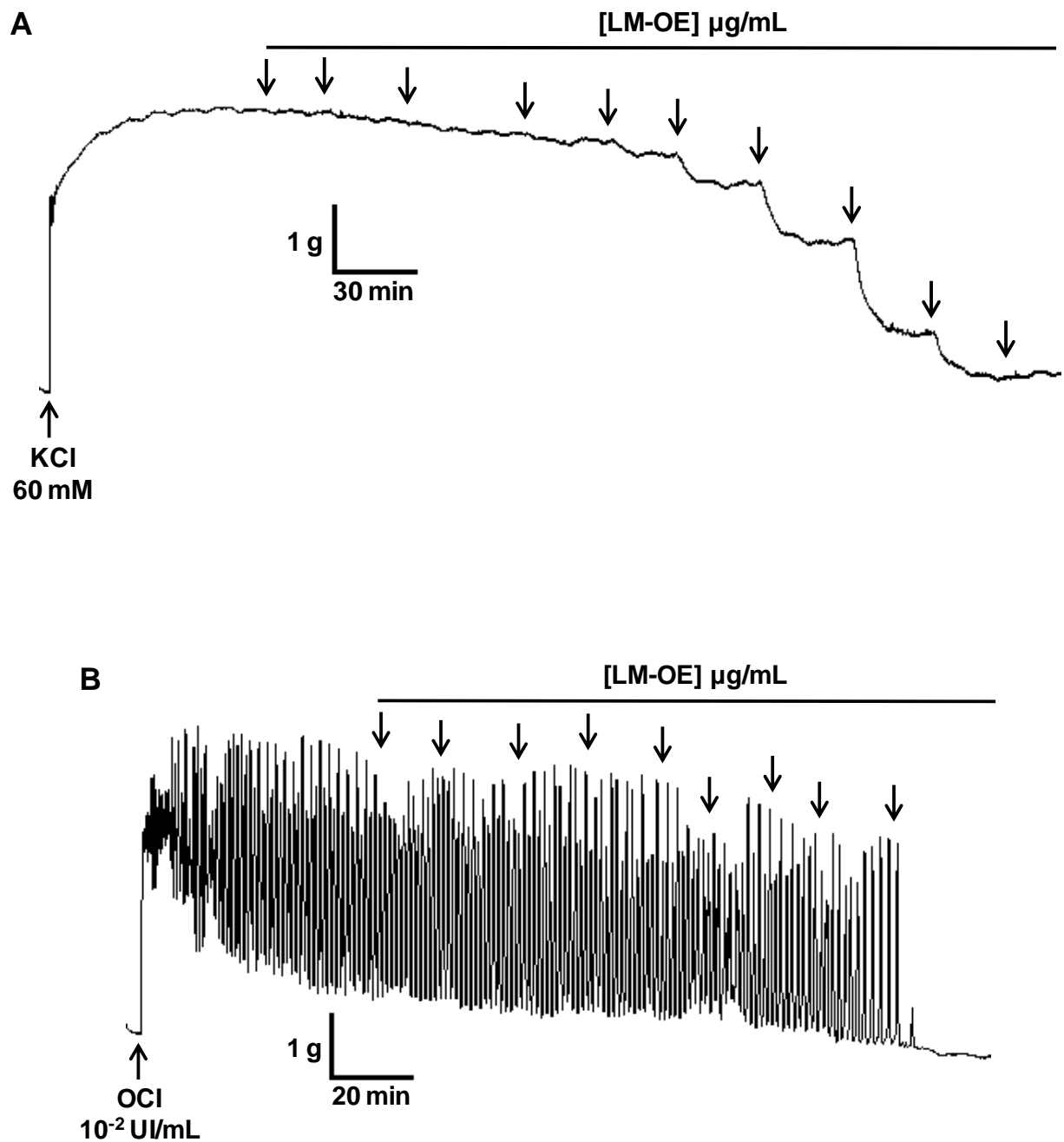
5.2 Investigação do mecanismo de ação tocolítica do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. em útero isolado de rata

5.2.1 Efeito tocolítico do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina

O LM-OE ($n = 5$) relaxou de maneira significativa o útero de rata pré-contraído com 60 mM de KCl (0,003-81 $\mu\text{g/mL}$) ou com 10^{-2} UI/mL de ocitocina (0,003-27 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 5A e 5B e Gráfico 5). Analisando os valores de CE_{50} , observou-se que o óleo foi equipotente em relaxar as contrações tônicas induzidas por KCl ($\text{CE}_{50} = 5,0 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$ e $R^2 = 0,96 \pm 0,008$) ou por ocitocina ($\text{CE}_{50} = 2,7 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$ e $R^2 = 0,88 \pm 0,03$) (Tabela 2).

Os valores de E_{max} do LM-OE foram atingidos na concentração de 81 $\mu\text{g/mL}$ para as contrações induzidas por KCl ($E_{\text{max}} = 98,8 \pm 0,8\%$) e de 27 $\mu\text{g/mL}$ para as contrações induzidas por ocitocina ($E_{\text{max}} = 100\%$).

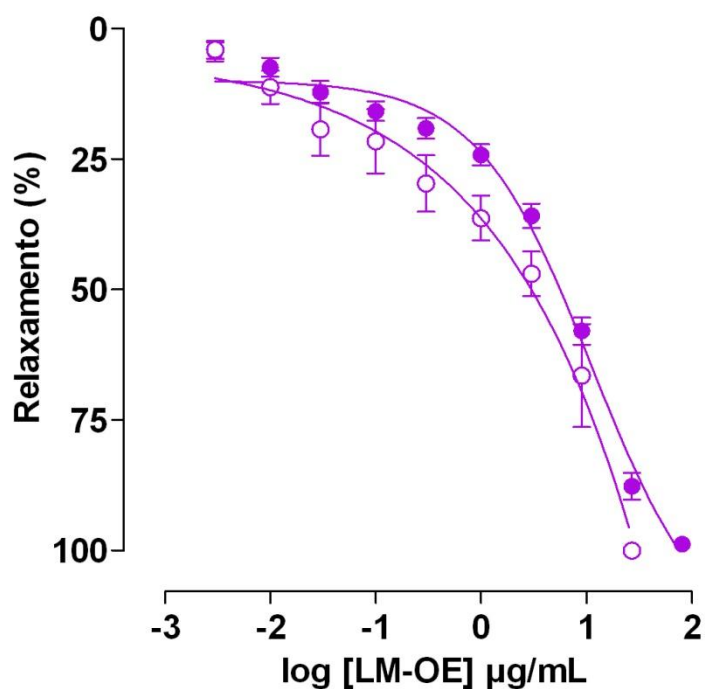
Figura 5 – Registros típicos do efeito relaxante do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (**A**) e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (**B**) em útero isolado de rata.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do LM-OE nas concentrações de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 $\mu\text{g/mL}$ (**A**) e de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e 27 $\mu\text{g/mL}$ (**B**), OCI = ocitocina.

Fonte: Autor, 2013.

Gráfico 5 – Efeito relaxante do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (●) e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (○) em útero isolado de rata.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$).

Fonte: Autor, 2013.

Tabela 2 – Valores de E_{\max} (%) e de CE_{50} (µg/mL) do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina em útero isolado de rata ($n = 5$).

Agentes contráteis	E_{\max} (%)	CE_{50} (µg/mL)
KCl	$98,8 \pm 0,8$	$5,0 \pm 0,8$
Ocitocina	100	$2,7 \pm 0,8$

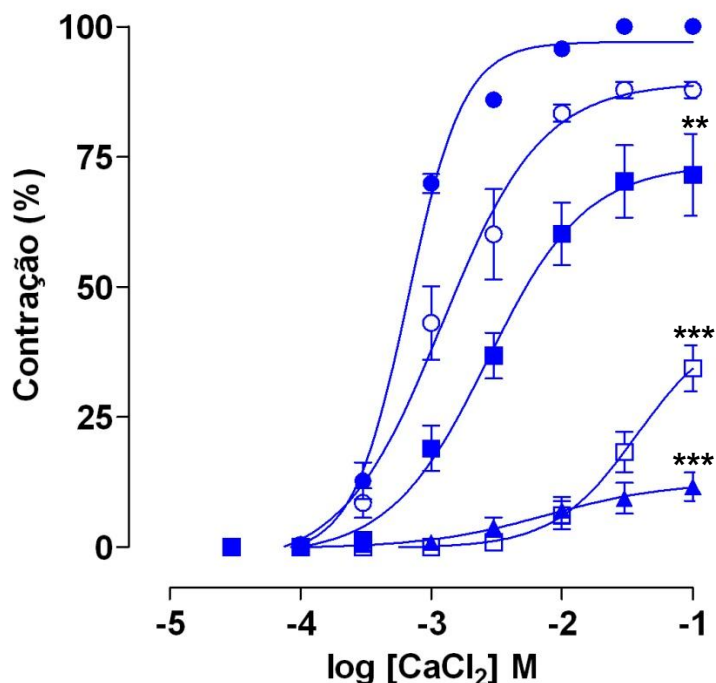
Fonte: Autor, 2013.

5.2.2 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) no efeito relaxante do LM-OE

5.2.2.1 Efeito tocolítico do LM-OE frente às contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca^{2+}

O LM-OE (9-243 $\mu\text{g/mL}$, $n = 5$) inibiu de maneira dependente de concentração e significativa as contrações cumulativas induzidas pelo aumento extracelular de CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca^{2+} . As curvas cumulativas controle do CaCl_2 foram desviadas para direita de forma não paralela e com redução do E_{max} de 100% para $87,8 \pm 1,6$; $71,5 \pm 7,9$; $34,3 \pm 4,4$ e $11,7 \pm 2,8\%$, respectivamente (Gráfico 6). Os valores de CE_{50} do CaCl_2 passaram de $7,1 \pm 0,4 \times 10^{-4}$ M (controle) para $1,5 \pm 0,4 \times 10^{-3}$; $2,7 \pm 0,5 \times 10^{-3}$; $1,9 \pm 0,5 \times 10^{-2}$ e $1,2 \pm 0,6 \times 10^{-2}$ M, respectivamente (Tabela 3).

Gráfico 6 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} na ausência (●) e na presença do LM-OE nas concentrações de 9 (○), 27 (■), 81 (□) e 243 (▲) $\mu\text{g/mL}$, em útero isolado de rata.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$).

Fonte: Autor, 2013.

Tabela 3 – Valores de E_{\max} (%) e de CE_{50} (M) do CaCl_2 na ausência e na presença do LM-OE em útero isolado de rata ($n = 5$).

LM-OE ($\mu\text{g/mL}$)	E_{\max} (%)	CE_{50} (M)
Controle	100	$7,1 \pm 0,4 \times 10^{-4}$
9	$87,8 \pm 1,6$	$1,5 \pm 0,4 \times 10^{-3}$
27	$71,5 \pm 7,9^{**}$	$2,7 \pm 0,5 \times 10^{-3}$
81	$34,3 \pm 4,4^{***}$	$1,9 \pm 0,5 \times 10^{-2*}$
243	$11,7 \pm 2,8^{***}$	$1,2 \pm 0,6 \times 10^{-2}$

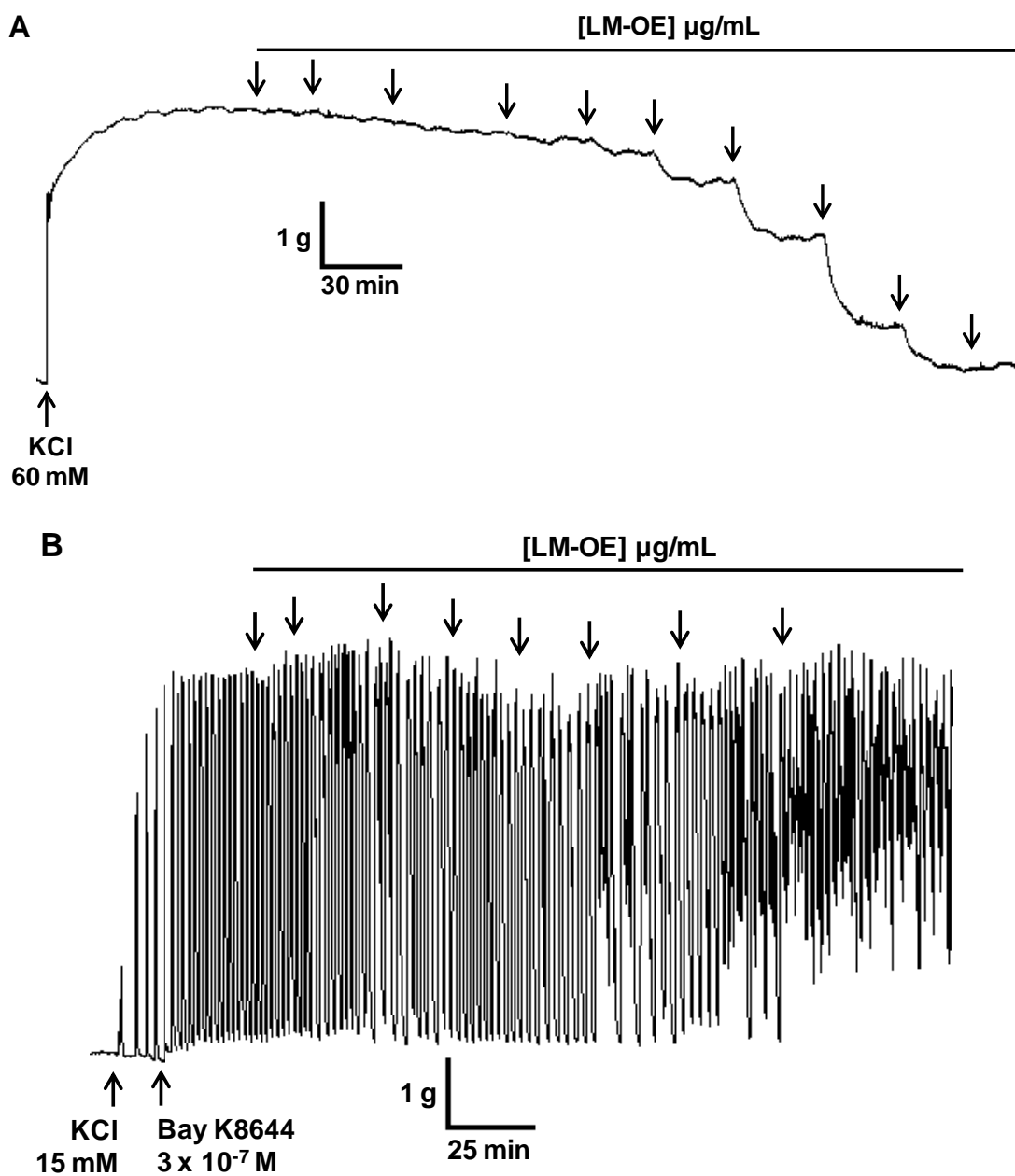
ANOVA "one-way" seguido do pós-teste de Bonferroni; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (controle vs. LM-OE).

Fonte: Autor, 2013.

5.2.2.2 Efeito do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644

O LM-OE (0,003-9 µg/mL) relaxou o útero de rata pré-contraído com 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 ($E_{\max} = 17,4 \pm 5,0$ µg/mL) em meio parcialmente despolarizado com 15 mM de KCl, porém com uma eficácia muito baixa e sem dependência de concentração (Figura 6 e Gráfico 7).

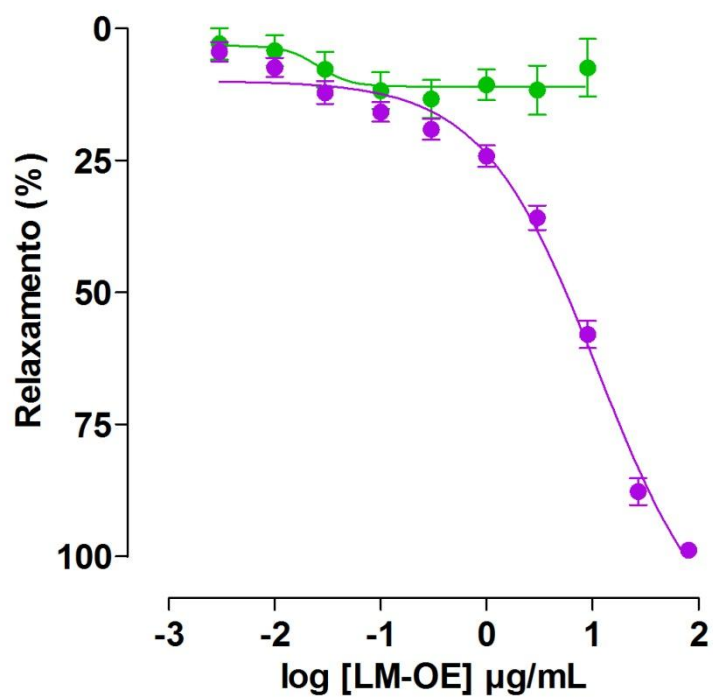
Figura 6 – Registros típicos do efeito relaxante do LM-OE em útero isolado de rata pré-contraído com 60 mM de KCl (**A**) e com 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 parcialmente despolarizado com 15 mM de KCl (**B**).



As setas para baixo representam a adição cumulativa do LM-OE nas concentrações de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 µg/mL (**A**) e de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3 e 9 µg/mL (**B**).

Fonte: Autor, 2013.

Gráfico 7 – Efeito relaxante do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (●) e por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (●).



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

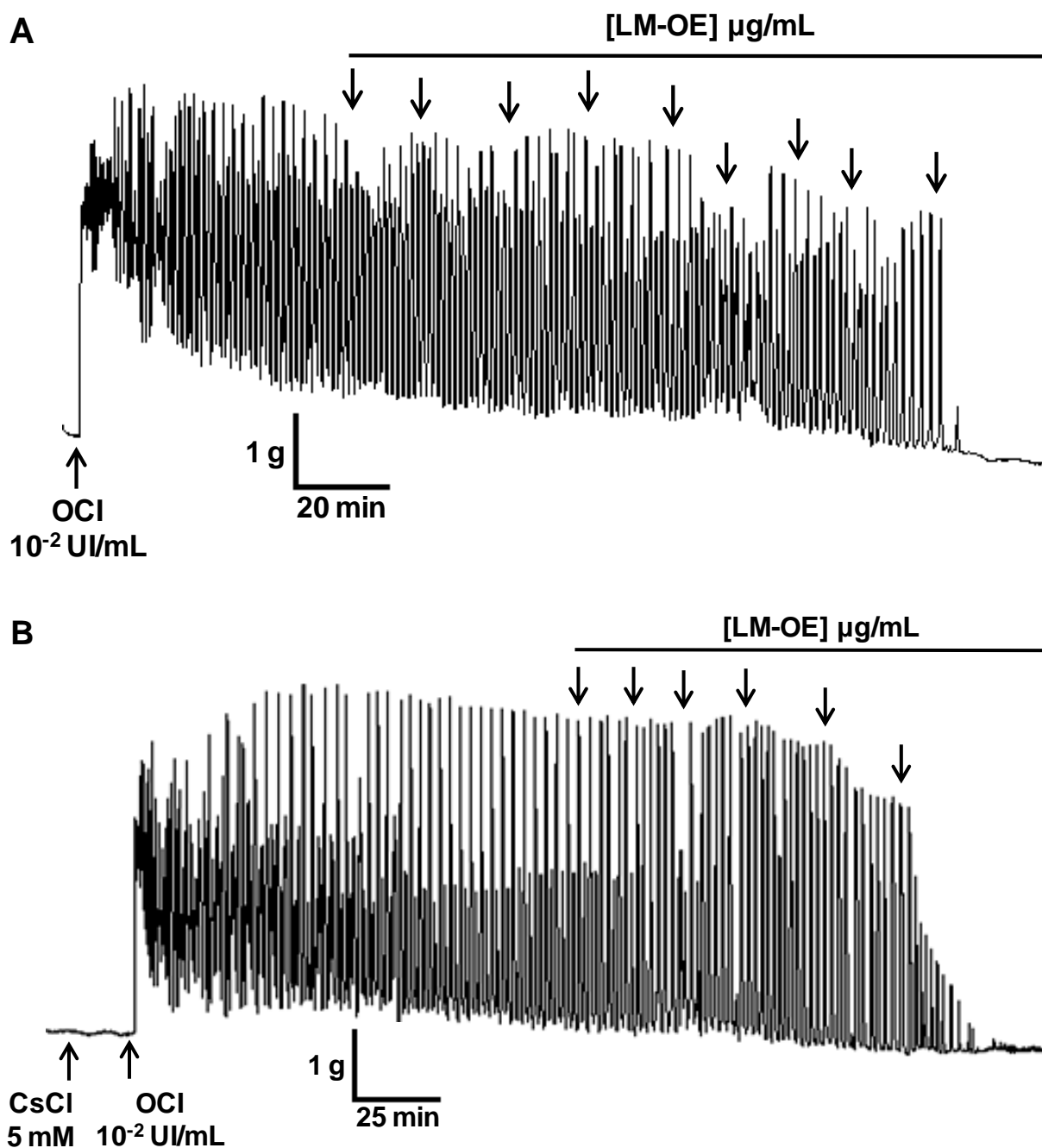
Fonte: Autor, 2013.

5.2.3 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito relaxante do LM-OE

5.2.3.1 Efeito do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl

A curva de relaxamento do LM-OE foi deslocada para direita na presença de 5 mM de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de potássio ($n = 3$). A potência relaxante do LM-OE ($CE_{50} = 30,3 \pm 2,2 \mu\text{g/mL}$ e $R^2 = 0,99 \pm 0,007$) foi reduzida em aproximadamente 11 vezes quando comparada ao relaxamento produzido pelo óleo na ausência de CsCl ($CE_{50} = 2,7 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$) (Figura 7 e Gráfico 8).

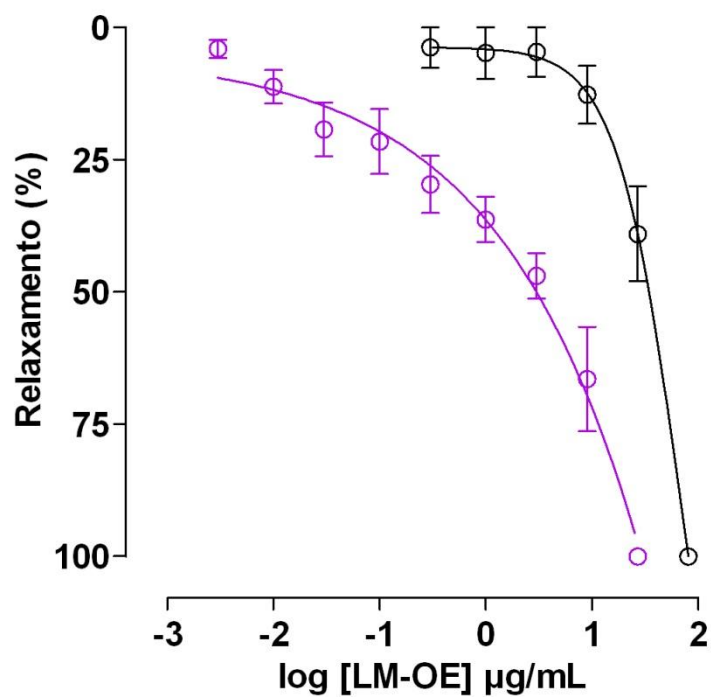
Figura 7 – Registros típicos do efeito relaxante do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 5 mM de CsCl em útero de rata.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do LM-OE nas concentrações de 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e 27 $\mu\text{g/mL}$ (A) e de 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 $\mu\text{g/mL}$ (B), OCI = ocitocina.

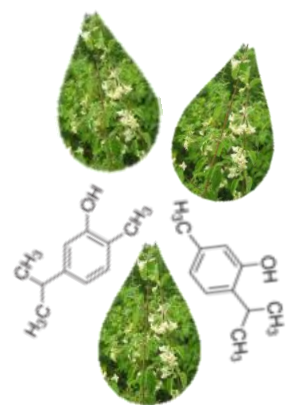
Fonte: Autor, 2013.

Gráfico 8 – Efeito relaxante do LM-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (○) e na presença (○) de 5 mM de CsCl em útero de rata.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 3-5).

Fonte: Autor, 2013.



6 Discussão

Neste trabalho, investigou-se o efeito tocolítico do LM-OE, assim como parte do mecanismo de ação deste efeito em útero de rata. Ao mesmo tempo, mostrou-se que os constituintes majoritários isolados, bem como a mistura timol-carvacrol apresentavam baixa eficácia, sugerindo que o efeito tocolítico exercido pelo óleo, possivelmente, seja devido ao complexo de substâncias nele encontrado.

Bakkali et al. (2008) apontaram, em revisão sobre óleos essenciais, que embora os componentes majoritários possam demonstrar atividade semelhante ao óleo, é mais interessante estudar o complexo, uma vez que o conceito de sinergismo parece ser mais significativo nesse tipo de droga. Recentemente, Oliveira (2013) demonstrou que o LM-OE e seus constituintes isolados (carvacrol, timol e mistura timol-carvacrol) apresentam atividade espasmolítica equipotente em íleo de cobaia. Assim sendo, estes achados corroboram essa afirmação.

Há relatos na literatura de que outros constituintes do LM-OE (Anexos 1 e 2) apresentam atividade espasmolítica em outros modelos de músculo liso, como é o caso do β -cariofileno, que apresenta atividade vasorrelaxante em aorta torácica de rato (FARIAS, 2006) e antiespasmódica em traqueia de rato (TEÓFILO, 2012); do *p*-cimeno, como antiespasmódico em traqueia de rato (TEÓFILO, 2012) e do γ -terpineno, como espasmolítico em jejuno de coelho (ASTUDILLO et al., 2004).

Geralmente, os constituintes majoritários dos óleos essenciais são os terpenoides, tanto monoterpenos, diterpenos, como sesquiterpenos (BAKKALI et al., 2008). Em estudos anteriores, em nosso laboratório, foi evidenciado que compostos como o labdano-302, o traquilobano-360 e o traquilobano-318, diterpenos isolados da espécie *Xylopija langsdorfiana* (RIBEIRO, 2003 e 2007, OLIVEIRA et al., 2006, RIBEIRO et al., 2007a, MACÊDO, 2008, TRAVASSOS, 2010, MARTINS et al., 2013), bem como os óleos essenciais das espécies *Xylopija langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul., *Xylopija frutescens* Aubl. e *Rollinia leptopetala* R. E. Fries (CORREIA, 2013) e *Lippia microphylla* Cham. (OLIVEIRA et al., 2012) apresentaram atividade espasmolítica em vários modelos de músculo liso.

Além disso, Oliveira (2013) demonstrou que o LM-OE e seus constituintes majoritários carvacrol e timol apresentaram efeito espasmolítico em íleo de cobaia e que o LM-OE atua por bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v , modulando negativamente os mecanismos de liberação de Ca^{2+} intracelular, além de reduzir o conteúdo de Ca^{2+} citosólico em células musculares lisas longitudinais. Com base nessas premissas decidiu-se investigar se o LM-OE e seus constituintes majoritários,

carvacrol e timol, apresentavam efeito espasmolítico em modelo de musculatura lisa uterina.

O útero é um órgão oco, que possui três camadas diferenciadas de músculo liso, essas são chamadas de endométrio, de miométrio (camada muscular espessa) e de serosa (camada externa). O miométrio possui importantes funções em processos fisiológicos como implantação do embrião, assim como na manifestação de distúrbios de dismenorreia e de interrupção da gravidez por aborto espontâneo (AGUILLAR; MITCHELL, 2010).

A procura por substâncias ou produtos biologicamente promissores estimula o crescente interesse na composição química dos óleos essenciais de plantas, assim como dos seus efeitos sobre a musculatura lisa (ASEKUN; GRIERSON; AFOLAYAN, 2007, SADRAEI; GHANNADI; MALEKSHAHI, 2003, MAGALHÃES et al., 2004, SILVA et al., 2010).

Na triagem farmacológica, demonstrou-se que o LM-OE apresentou efeito tocolítico em útero de rata por inibir as contrações fásicas induzidas por CCh e por ocitocina (Gráfico 1A e 1B), sendo cerca de 4,5 vezes mais potente para o CCh. Esses resultados sugerem que o óleo poderia está agindo, pelo menos em parte, em nível de receptor farmacológico muscarínico, mas outros experimentos são necessários para confirmar ou descartar essa hipótese.

Enquanto que os constituintes majoritários isolados, carvacrol e timol, e a mistura timol-carvacrol, apresentaram baixa eficácia em útero de rata frente ao agonista carbacol (Gráfico 2A, 3A e 4A). Quando comparados os valores de E_{max} , observou-se que não houve diferença estatística entre os constituintes, sugerindo que não houve potencialização de efeito e que eles podem estar agindo pela mesma via de sinalização para promover seu efeito tocolítico frente a este agonista (Tabela 1). Efeito similar foi observado para o timol e a mistura timol-carvacrol (Gráfico 3B e 4B) frente ao agonista ocitocina, efeito este não verificado para o carvacrol (Gráfico 2B), sendo a mistura timol-carvacrol estatisticamente mais eficaz que os constituintes isoladamente (Tabela 1), indicando uma possível potencialização dos efeitos quando os constituintes estão em conjunto.

Dessa forma, podemos inferir que o efeito tocolítico frente à ocitocina é mais dependente da interação entre os dois constituintes majoritários do óleo. Estes resultados corroboram os achados de Oliveira (2013), frente ao agonista carbacol, em íleo de cobaia, sendo a mistura timol-carvacrol mais eficaz em útero de rata.

Diante disso, decidiu-se prosseguir com a investigação do mecanismo de ação tocolítica do LM-OE.

O íon Ca^{2+} é um mensageiro secundário intracelular responsável por desencadear uma variedade de processos celulares em neurônios, músculos e muitas células não excitáveis tendo como função mais importante a sinalização celular quando do aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (BERRIDGE; DUPONT, 1995; BERRIDGE, 1997; BERRIDGE; BOOTMAN; LIPP, 1998; BERRIDGE; LIPP; BOOTMAN, 2000; BOOTMAN; LIPP; BERRIDGE, 2001; SCHUSTER; MARHL; HÖFER, 2002). O Ca^{2+} , um regulador celular universal (CAMPBELL, 1983), é o sinal primário responsável pela ativação da contração do músculo liso (NEERING; MORGAN, 1980; MORGAN; MORGAN, 1982).

A contração do músculo liso é disparada principalmente pelo aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$, e pode ser gerada tanto via despolarização de membrana, que ativa os Ca_v , como pela ligação de um agonista ao seu respectivo receptor, que pode ser independente do potencial de membrana (SOMLYO; SOMLYO, 2003), esses mecanismos são denominados de acoplamento eletromecânico e fármaco-mecânico, respectivamente (SOMLYO; SOMLYO, 1968). Agonistas como o CCh e a ocitocina ligam-se a receptores GPCRs e ativam a cascata de fosfoinosítídeos, geralmente através da produção de IP_3 , que é mediada pelas proteínas G_q e G_{11} , estimulando, assim a liberação de Ca^{2+} do RS (FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001). Os agonistas contráteis podem também elevar a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ através de receptores de rianodina e estimular a entrada de Ca^{2+} através dos múltiplos tipos de canais, incluindo canais para Ca^{2+} operados por estoque, por receptor ou por voltagem (SANDERS, 2001; McFADZEAN; GIBSON, 2002).

Em músculo liso, vários agentes contráteis causam uma resposta contrátil bifásica, consistindo em uma contração inicial transiente chamada de componente fásico (< 30 s), seguido por uma contração sustentada denominada componente tônico, que se desenvolve lentamente ao longo de 15 minutos e é mantida durante o período de exposição ao agente contrátil (VAN BREEMEN; AARONSON; LOUTZENHISER, 1979; BOLTON, 1979).

Diante do exposto e sabendo-se que os mecanismos envolvidos na manutenção da fase tônica são diferentes em relação aos da fase fásica da contração (ABDELLATIF, 1989; KOBAYASHI et al., 1989; HONDA; TAKANO;

KAMIYA, 1996), surgiu o seguinte questionamento: o LM-OE promoveria o relaxamento do útero pré-contráído com KCl ou com ocitocina?

Para verificar esta hipótese, avaliou-se o efeito do óleo sobre o componente tônico da resposta contrátil induzida por KCl (acoplamento eletromecânico) e por ocitocina, que age por acoplamento misto (fármaco e eletromecânico) em útero isolado de rata. O LM-OE relaxou, de maneira significativa e equipotente, o útero pré-contráído tanto por KCl como por ocitocina (Figura 5A e 5B e Gráfico 5). Como um dos passos comuns às vias de sinalização desses agentes contráteis é a despolarização da membrana plasmática, com consequente abertura dos Ca_V que leva a um influxo de Ca^{2+} , resultando na manutenção da fase tônica da contração (WRAY, 1993), sugere-se que o LM-OE age por bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_V para exercer seu efeito tocolítico.

Sendo assim, questionamos se o LM-OE estaria de algum modo interferindo no influxo de cálcio através dos Ca_V em útero de rata. Para testar essa hipótese, foram realizadas curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem cálcio, na ausência e na presença de diferentes concentrações do óleo. Este protocolo baseia-se no fato de que a contração ocorrerá, quase que exclusivamente, pelo Ca^{2+} proveniente do meio extracelular, já que a despolarização promovida pelo aumento da concentração de K^+ extracelular ($[\text{K}^+]_e$) induz a abertura dos Ca_V (REMBOLD, 1996).

O fato da curva controle do CaCl_2 ter sido deslocada para a direita de maneira não paralela, com redução do E_{max} e da potência espasmogênica na presença do LM-OE (Gráfico 6 e Tabela 3) sugere que o mesmo esteja agindo por bloquear o influxo de cálcio através dos Ca_V para exercer seu efeito tocolítico em útero de rata,.

No músculo liso, os Ca_V -L são melhores caracterizados e os maiores responsáveis pelo influxo de Ca^{2+} , cujo sítio de ligação para seus bloqueadores está na subunidade α_1 , embora nele existam quatro outras unidades complexadas (2 α , 1 β e 1 γ) (VOGALIS et al., 1991; KURIYAMA; KITAMURA; NABATA, 1995; KNOT et al., 1996). Um dos Ca_V envolvidos com funções fisiológicas da contração do músculo liso é o Ca_V 3.2 ou Ca_V -T (SARSERO et al., 1998; CATTERALL et al., 2005), além dos canais que são mais expressos, os Ca_V -L (BOLTON, 1979; TOMITA, 1981), descritos por Catterall e colaboradores (2005) como Ca_V 1.

As correntes através de canais iônicos têm sido bem caracterizadas em miométrio de ratas e de humanos. No miométrio de rata é encontrado tanto canais

lentos de Ca_v1 como canais rápidos de Na^+ , mas não os canais de Ca^{2+} do tipo T, enquanto que no miométrio de humanos é expressado os canais de Ca^{2+} dos tipos L e T (ASOKAN et al., 2002). Além disso, já é bem estabelecido que em útero de rata os Ca_v1 , em resposta a uma despolarização de membrana, levam ao influxo de Ca^{2+} e, conseqüentemente, à contração (WRAY et al., 2003).

Com o intuito de verificar se o Ca_v envolvido na ação tocolítica do LM-OE seria o Ca_v da família 1, avaliou-se seu efeito sobre as contrações tônicas induzidas pelo derivado di-hidropiridínico S-(-)-Bay K8644, um agonista desses canais (SPEDDING; PAOLETTI, 1992). O fato do LM-OE ter relaxado o útero de rata pré-contraído com esse agonista com uma eficácia muito baixa e sem dependência de concentração (Figura 6 e Gráfico 7) é sugestivo de que o óleo não bloqueia diretamente o influxo de cálcio através dos Ca_v1 para promover seu efeito tocolítico.

Na contração induzida por KCl existe, além da despolarização de membrana, outros mecanismos de manutenção da contração tônica, tais como a sensibilização ao Ca^{2+} envolvendo a translocação e ativação da RhoA cinase, bem como a ativação da proteína cinase II dependente de Ca^{2+} -calmodulina (CaMKII) ou a proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK) (RATZ et al., 2005). No entanto, não se descarta outros mecanismos que possam estar envolvidos no mecanismo de ação tocolítica do LM-OE em útero de rata como, por exemplo, a modulação positiva dos canais de K^+ .

Os canais de potássio desempenham um papel chave na regulação do potencial de membrana e na excitabilidade celular, sendo a contração do músculo liso dependente do balanço entre o aumento da condutância ao íon K^+ , levando a uma repolarização/hiperpolarização, e a diminuição da condutância a este íon, ocasionando uma despolarização de membrana (KNOT et al., 1996). Estes canais estão envolvidos em várias funções fisiológicas, tais como a manutenção do potencial de repouso das membranas celulares e a secreção de hormônios e neurotransmissores. Sua atividade pode ser regulada por voltagem, íons Ca^{2+} , neurotransmissores e suas vias de sinalização, estímulos químicos e físicos, incluindo a tensão de oxigênio, pH, lipídios, estiramento mecânico, GPCRs, entre outros estímulos (LESAGE; LAZDUNSKI, 2000; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). O movimento dos íons K^+ através de canais localizados na membrana regulam o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v (THORNELOE; NELSON, 2005).

O efluxo de potássio em células do miométrio resulta em repolarização da membrana e esse efluxo é a corrente iônica primária responsável pela manutenção do potencial de repouso no útero. No músculo liso uterino, os canais de K^+ mais abundantes e mais estudados são: canais de potássio dependentes de voltagem (K_V); canais de potássio ativados por cálcio de grande condutância (BK_{Ca}); canais de potássio ativados por cálcio de pequena condutância (SK_{Ca}) e canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007).

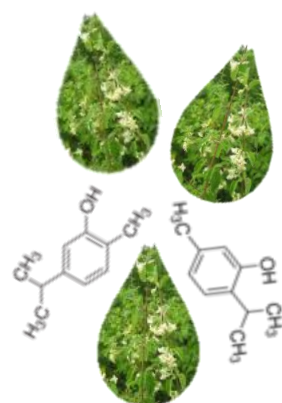
A associação entre o aumento da atividade dos canais de K^+ e o relaxamento do músculo liso vem sendo estudada em vários tecidos e com diversos canais de K^+ . Alguns autores apresentam evidências da participação de vários desses canais na regulação do músculo liso, tanto em nível funcional como em nível eletrofisiológico, como por exemplo: K_V em íleo de cobaia (LIMA, 2004; CAVALCANTE, 2008) e aorta de rato (RIBEIRO et al., 2007a); BK_{Ca} em músculo longitudinal de íleo de cobaia (UYAMA; IMAIZUMI; WATANABE, 1993), miométrio humano (ANWER et al., 1993, MEERA et al., 1995), traqueia de cão (WADE; SIMS, 1993), aorta de coelho (DEMIREL et al., 1994), traqueia de cobaia (HIRAMATSU et al., 1994; RIBEIRO, 2007), traqueia de porco (KUME et al., 1994; KANNAN; JOHNSON, 1995; YAMAKAGE; HIRSHMAN; CROXTON, 1996), artérias submucosas e mesentéricas de cobaia (HILL et al., 1997), íleo de cobaia (SILVA; NOUAILHETAS; ABOULAFIA, 1999; CAVALCANTE, 2001; CAVALCANTE, 2008; LIMA, 2008), artéria mesentérica de rato (OLIVEIRA et al., 2004), útero de rata (LIMA, 2008, TRAVASSOS et al. 2009); SK_{Ca} em aorta de rato (SILVA et al., 1994), útero de rata (SILVA; OKUYAMA; PAIVA, 1996) e íleo de cobaia (CAVALCANTE, 2008, MACÊDO, 2008). K_{ATP} em íleo (SUN; BENISHIN, 1994) e traqueia de cobaia (SHIKADA; TANAKA, 1995), músculo longitudinal de íleo de rato (DAVIES; McCURRIE; WOOD, 1996), uretra de cobaia (TERAMOTO; BRADING; ITO, 1999), traqueia de gato (TERAMOTO; NAKASHIMA; ITO, 2000) e íleo de cobaia (CAVALCANTE, 2008, MACÊDO, 2008).

Sabendo-se da importância dos canais de K^+ na musculatura do miométrio e de sua capacidade de modular os Ca_v na resposta contrátil, formulou-se mais uma hipótese: o LM-OE estaria inibindo as contrações uterinas por ativar os canais de K^+ e, indiretamente, bloquear os canais de Ca^{2+} ? Para confirmar essa hipótese, avaliou-se o efeito do óleo sobre as contrações induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl, um bloqueador inespecífico de canais de K^+ (LATORRE et al., 1989). Observou-se que a curva de relaxamento na presença do CsCl foi

desviada para direita com redução da potência relaxante em 11 vezes (Figura 7 e Gráfico 8), confirmando a participação desses canais no mecanismo de ação tocolítica do LM-OE. Entretanto, outros estudos serão necessários para melhor elucidar como o óleo modula os canais de potássio e quais subtipos destes canais estão envolvidos nesse efeito.

Resultados divergentes foram observados por Oliveira (2013) em íleo de cobaia, onde o mecanismo de ação espasmolítica do LM-OE não ocorre por ativação/modulação positiva dos canais de K^+ , e sim por bloqueio dos Ca_v . Dessa forma, o LM-OE age por mecanismos distintos em íleo de cobaia e útero de rata para promover seu efeito espasmolítico.

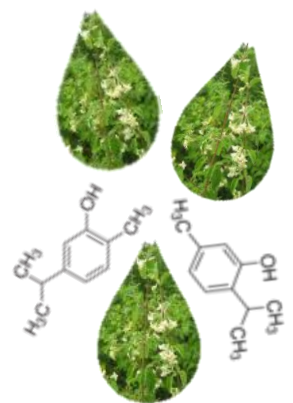
Os canais iônicos do miométrio vêm sendo alvos de novas drogas que possam ser usadas terapeuticamente no combate ao trabalho de parto pré-maturo e cólicas uterinas. Diante disso, este trabalho revela que o LM-OE possui atividade tocolítica, mostrando que os óleos essenciais são compostos de interesse no tocante a modulação da contratilidade uterina. Espera-se que os resultados aqui apresentados contribuam como potencial terapêutico para os distúrbios acima ou como ferramenta farmacológica para um melhor entendimento do mecanismo excitação/contração em útero de rata.



7 Conclusões

Na investigação do efeito tocolítico do óleo essencial das folhas de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) e de seus constituintes majoritários isolados, carvacrol e timol, assim como da mistura timol-carvacrol em útero de rata, pode-se concluir que:

- O LM-OE apresenta efeito tocolítico não seletivo;
- O carvacrol, timol e a mistura timol-carvacrol (1,46:1) apresentam baixa eficácia tocolítica;
- O LM-OE não bloqueia diretamente o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v1 ;
- O efeito tocolítico do LM-OE envolve a ativação/modulação positiva dos canais de K^+ o que, indiretamente, reduz o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v com consequente relaxamento do útero de rata.



Referências

ABAD, M. J.; SÁNCHEZ, S.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.; CARRASCO, L. Antiviral activity of some medicinal plants. **Methods and Findings**, v. 17 (Suppl. A), p. 108, 1995. Apud PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.

ABDELLATIF, A. A. Calcium mobilizing receptors, polyphospholinositides, generation of second messengers and contraction in mammalian smooth muscle: historical perspectives and current status. **Life Sciences**, v. 45, p. 757-786, 1989.

ABDELWAHAB, S. I.; MOHAMED, A. H.; MOHAMED, O. Y.; OALL, M.; TAHA, M. M. E.; MOHAN, S.; NOORDIN, M. I.; MUSTAFA, M. R.; ALKHARFY, K. M. Erectogenic effects of *Clerodendron capitatum*: involvement of phosphodiesterase type-5 inhibition. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 472-508, 2008.

AGUILLAR, H. N.; MICTHELL, B. F. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. **Human Reproduction Update**, v. 16, p. 725-744, 2010.

ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 2nd edition (2007 Revision). **British Journal of Pharmacology**, v. 150 (Suppl. 1), p. S1-S168, 2007.

ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5rd edition. **British Journal of Pharmacology**, v. 164 Suppl 1, p. S142-143, 2011.

ALVES, R. R. N.; ROSA, I. L. Why study the use of animal products in traditional medicines? **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, p. 1-5, 2005.

ANTUNES, R. O. G.; SILVA A. C. S.; OLIVEIRA P. R.; SILVA L. P. S.; MAGALHÃES B. S.; SILVA A. P. S.; TAVARES J. F.; ABOULAFIA J.; NOUAILHETAS V. L. A.; SILVA J. L. V. Relaxant effects of *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) on rat trachea and aorta. **XX Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina**, Fortaleza, Ceará, 2011.

ANWER, K.; OBERTI, C.; PEREZ, G. J.; PEREZ-REYES, N.; McDOUGALL, J. K.; MONGA, M.; SANBORN, B. M.; STEFANI, E.; TORO, L. Calcium-activated K⁺ channels as modulators of human myometrial contractile activity. **American Journal of Physiology**, v. 265, n. 4, p. C976-C985, 1993.

ARAÚJO, I. G. A. Efeitos Hipotensor e Vasorrelaxante do Óleo Essencial de *Lippia microphylla* Cham. e de seu Constituinte Principal Timol: Envolvimento do Bloqueio de Canais para Cálcio. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos**

Bioativos), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2011.

ASEKUN, O. T.; GRIERSON, D. S.; AFOLAYAN, A. J. Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. Capensis. **Food Chemistry**, v. 101, p. 995-998, 2007.

ASOKAN, K. T.; SARKAR, S. N.; MISHRA, S. K.; RAVIPRAKASH, V. Effects of mibefradil on uterine contractility. **European Journal of Pharmacology**, v. 455, p. 65-71, 2002.

ASTUDILLO, A.; HONG, E.; BYE, R.; NAVARRETE, A. Antispasmodic activity of extracts and compounds of *Acalypha phleoides* Cav. **Phytotherapy Research**. v. 18, n. 2, p. 102-106, 2004.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARREIRO, E. J. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BEER, A. M.; LUKANOV, J.; SAGORCHEV, P. Effect of thymol on the spontaneous contractile activity of the smooth muscles. **Phytomedicine**. v. 14, p.65-69, 2007.

BEGROW, F.; ENGELBERTZ, J.; FEISTEL, B.; LEHNFELD, R.; BAUER, K.; VERSPOHL, E. J. Impact of thymol in thyme extracts on their antispasmodic action and ciliary clearance. **Planta Medica**. v. 76, n. 4, p. 311-318, 2010.

BERRIDGE, M. J; DUPONT, G. Spatial and temporal signalling by calcium. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 6, p. 267-274, 1995.

BERRIDGE, M. J. Elementary and global aspects of calcium signalling. **Journal of Physiology**, v. 499, p. 291-306, 1997.

BERRIDGE, M. J. Elementary and global aspects of calcium signalling. **Journal of Physiology**, v. 499, p. 291-306, 1997. BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; LIPP, P. Calcium – a life and death signal. **Nature**. v. 395, p. 645-648, 1998.

BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signaling. **Natural Reviews**, v. 1, p. 11-21, 2000.

BERRIDGE, M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 21, p. 5047-5061, 2008.

BERRIDGE, M. J. Cell Signalling Pathways. In: **Cell Signalling Biology**. Portland Press Limited , p. 1-118, 2009a.

BILLINGTON, C. K.; PENN, R. B. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. **Respiratory Research**, v. 4, n. 1, p. 2, 2003.

BLAUSTEIN, M. P. Sodium/Calcium exchange in cardiac, smooth and skeletal muscles: key to the control of contractility. **Current Topics in Membranes and Transport**, p. 289-330, 1989.

BOLTON, T. B. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth-muscle. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 606-718, 1979.

BOOTMAN, H.; LIPP, P.; BERRIDGE, M. J. The organization and functions of local Ca^{2+} signals. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 2213-2222, 2001.

BRAINARD, A. M.; KOROVKINA, V. P.; ENGLAND, S. K. Potassium channels and uterine function. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 18, n. 3, p. 332-339, 2007.

BRASIL. Anvisa. **Resolução de Diretoria Colegiada nº 14/2010**. Brasília, DF, março, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: **Anvisa**, p. 126, 2011.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B.; RAE, G. A. Effects of endothelins, Bay K 8644 and other oxytocics in non-pregnant and late pregnant rat isolated uterus. **European Journal of Pharmacology**, v. 192, p. 109-116, 1991.

CAMPBELL A. K. **Intracellular Calcium: Its Universal Role as Regulator**. Chichester, UK: Wiley, 1983.

CARAFOLI, E.; BRINI, M. **Calcium signalling and disease: molecular pathology of calcium**. [S.l.]: Springer, 2007.

CASTEELS, R.; SUZUKI, H. The effect of histamine on the smooth muscle cells of the ear of the rabbit. *Pfluegers Arch.* **European Journal of Physiology**, v. 387, p. 17-25, 1980.

CATTERALL, W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. **Annual Review of Cell & Developmental Biology**, v. 16, p. 521-555, 2000.

CATTERALL, W. A.; PEREZ-REYES, E.; SNUTCH, T. P.; STRIESSNIG, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 411-425, 2005.

CATTERALL, W. A. Voltage-Gated Calcium Channels, **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, p. 1-24, 2011.

CAVALCANTE, F. A. Mecanismo de ação espasmolítica de solavetivona, sesquiterpeno isolado das partes aéreas de *Solanum jabrense* Agra & Nee (SOLANACEAE). **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2001.

CAVALCANTE, F. A. Investigação dos efeitos citotóxico e espasmolítico do lapachol e de seus derivados naturais e sintéticos: relação estrutura-atividade e mecanismo de ação. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2008.

CAVALCANTE MELO, F. H.; RIOS, E. R.; ROCHA, N. F.; CITÓ, M. D. O. C.; FERNANDES, M. L.; DE SOUSA, D. P.; DE VASCONCELOS, S. M.; DE SOUSA, F. C. Antinociceptive activity of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 12, p. 1722-1729, 2012.

CERQUEIRA, M. D.; MARQUES, E. J.; MARTINS, D.; ROQUE, N. F.; CRUZ, F. G.; GUEDES, M. L. S. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1544-1548, 2009.

CONTE-CAMERINO, D.; LOGRANO, M. D.; DE LUCIA, A.; PERSICHELLA, M.; FRANCONI, F. The effects of the calcium channel agonist, Bay K8644, on guinea-pig ileum ant rat uterine horn. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 39, p. 954-957, 1987.

CORREIA, A. C. C. Estudo Comparativo da Atividade Espasmolítica de Óleos Essenciais de Espécies de Annonaceae: *Rollinia leptopetala* R. E. Fries, *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. e *Xylopia frutescens* Aubl. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2013.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRUZ, T. CABO, M. M.; JIMÉNEZ, J.; ZARZUELO, A. Composition and pharmaceutical activity of the essential oil of *Satureja obovata*. II. Spasmolytic activity. **Journal Fitoterapia**, v. 61, n. 3, p. 247-251, 1990.

DAVID, J. P.; MEIRA, M.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, H. N.; BRANCO, A.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V.; QUEIROZ, L. P.; GIULIETTI, A. M. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, p. 215-218, 2007.

DAVIES, M. P.; McCURRIE, J. R.; WOOD, D. Comparative effects of K⁺ channel modulating agents on contractions of rat intestinal smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 297, n. 3, p. 249-256, 1996.

DELLIS, O.; DEDOS, S. G.; TOVEY, S. C.; TAUFIQ-UR-RAHMAN, DUBEL, S. J.; TAYLOR, C. W. Ca^{2+} entry through plasma membrane IP_3 receptors. **Science**, v. 313, n. 5784, p. 229-233, 2006.

DEMIREL, E.; RUSKO, J.; LASKEY, R. E.; ADAMS, D. J.; VAN BREEMEN, C. TEA inhibits ACh-induced EDRF release: endothelial Ca^{2+} -dependent K^+ channels contribute to vascular tone. **The American Journal of Physiology**, v. 267, n. 2, H1135-H1141, 1994.

DEVI, K. P.; SREEPRIYA, M.; DEVAKI, T.; BALAKRISHNA, K. Antinociceptive and hypnotic effects of *Premna tomentosa* L. (Verbenaceae) in experimental animals. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 261-264, 2003.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000. Apud ARAÚJO, I. G. A. Efeitos Hipotensor e Vasorrelaxante do Óleo Essencial de *Lippia microphylla* Cham. e de seu Constituinte Principal Timol: Envolvimento do Bloqueio de Canais para Cálcio. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2011.

DU, J.; YU, Y.; KE, Y.; WANG, C.; ZHU, L.; QIAN, Z. M. Ligustilide attenuates pain behavior induced by acetic acid or formalin **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 211-214, 2007.

DUA, V. K.; PANDEY, A. C.; SINGH, R.; SHARMA, V. P.; SUBBARAO, S. K. Isolation of repellent ingredients from *Lantana camara* (Verbenaceae) flowers and their repellency against *Aedes* mosquitoes. **Journal of Applied Entomology**, v. 127, p. 509-511, 2003.

EVANGELISTA, G. L.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; SANTOS, C. F.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LOPES, E. A. B.; SANTOS, M. V.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C. Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 515-522, 2007.

FARIAS, M. S. Q. Efeitos do óleo essencial de *Croton argyrophylloides* Muell. Arg. e do β -cariofileno sobre a contratilidade de anéis de aorta de rato. **Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas)**. Universidade Estadual do Ceará, 2006.

FERRO, A. F. P.; BONACELLI, M. B. M.; ASSAD, A. L. D. Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: O uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão & Produção**, v. 13, n. 3, p. 489-501, 2006.

FLISCHER, F.; MONTARI, C. A. Química medicinal: contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. **Química Nova**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 56-64, 1995.

FOWLER, M. W. Review Plants, medicines and man. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1797-1804, 2006.

FUKATA, Y.; AMANO, M.; KAIBUCHI, K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 1, p. 32-39, 2001.

GASQUET, M.; DELMAS, F.; TIMÓN-DAVID, P.; KEITA, A.; GUINDO, M.; KOITA, N.; DIALLO, D.; DOUMBO, O. Evaluation *in vitro* and *in vivo* of a traditional antimalarial, 'Malarial-5'. **Fitoterapia**, v. 64, p. 423-426, 1993. Apud PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.

HENRIQUE, A. T.; SIMÕES-PIRES, C.; APEL, M. A. Óleos essenciais: Importância e perspectiva terapêuticas. In: YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**: 2ª ed. - Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, Cap. IX, p. 221-256, 2009.

HILL, C. E.; KIRTON, A.; WU, D. D.; VANNER, S. J. Role of maxi-K⁺ channels in endothelin-induced vasoconstriction of mesenteric and submucosal arterioles. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 36, n. 5, p. G1087-G1093, 1997.

HILL-EUBANKS, D. C.; WERNER, M. E.; HEPPNER, T. J.; NELSON, M. T. Calcium Signaling in Smooth Muscle. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 27, p. 1-21, 2011.

HIRAMATSU, T.; KUME, H.; KOTLIKOFF, M. I.; TAKAGI, K. Role of calcium-activated potassium channels in the relaxation of tracheal smooth muscles by forskolin. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 21, n. 5, p. 367-375, 1994.

HONDA, K.; TAKANO, Y.; KAMIYA, H. Involvement of protein kinase C in muscarinic agonist-induced contractions of guinea pig ileal longitudinal muscle. **General Pharmacology**, v. 27, n. 6, p. 957-961, 1996.

HUBINOT, C.; DEBIEVE, F. Prevention of Preterm Labour: 2011 Update on Tocolysis. **Journal of Pregnancy**, 2011.

JACINTO, K. R.; SILVA, I. A.; CARVALHO, V. S.; CAVALCANTI, V. B.; TAVARES, J. F.; NOUAILHETAS, V. L. A.; BERALDO J.; SILVA, J. L. V. Etnofarmacologia de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae): Potencial propriedade gastrointestinal em ratos. **XX Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina**, Fortaleza, Ceará, 2011.

JOCA, H. C.; CRUZ-MENDES, Y.; OLIVEIRA-ABREU, K.; MAIA-JOCA, R. P.; BARBOSA, R.; LEMOS, T. L.; LACERDA BEIRÃO, P. S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Carvacrol decreases neuronal excitability by inhibition of voltage-gated sodium channels. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 9, p. 1511-1517, 2012.

- KANNAN, M. S.; JOHNSON, D. E. Modulation of nitric oxide-dependent relaxation of pig tracheal smooth muscle by inhibitors of guanylyl cyclase and calcium activated potassium channels. **Life Science**, v. 56, n. 25, p. 2229-2238, 1995.
- KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K. I.; HARADA, K. I.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K. J.; SATO, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, v. 49, n. 2, p. 157-230, 1997.
- KIM, H. R.; APPEL, S.; VETTERKIND, S.; GANGOPADHYAY, S. S.; MORGAN, K. G. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 6a, p. 2165-2180, 2008.
- KINGSTON, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 496-511, 2011.
- KLUEGER, P. A.; DAROS, M. R.; SILVA, R. M.; FARIAS, M. R.; DE LIMA T. C. M. Neuropharmacological evaluation of crude and semipurified extracts from *Lippia alba* Will. N.E. Br. (Verbenaceae). Abstracts. **International Joint Symposium. Chemistry, Biological and Pharmacological Properties of Medicinal Plants from the Americas. Poster Session, 2: B23**, 1997. Apud PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.
- KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In BÁRÁNY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**. San Diego, Academic Press, 203-219, 1996.
- KOBAYASHI, S.; KITAZAWA, T.; SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and α -adrenergic Ca^{2+} -release in smooth muscle: physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 17997 - 18004, 1989.
- KUME, H.; HALL, I.P.; WASHBAU, R.J.; TAKAGI, K.; KOTLIKOFF, M. I. β -Adrenergic agonists regulate K_{ca} channels in airway muscle by cAMP-dependent and -independent mechanisms. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 1, p. 371-379, 1994.
- KURIYAMA, H.; KITAMURA, K.; NABATA, H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. **Pharmacological Reviews**, v. 47, n. 3, p. 387-573, 1995.
- LAHLOU, S.; FIGUEIREDO, A. F.; MAGALHÃES, P. J. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; PINTO, D. G. Cardiovascular effects of methyleugenol, a natural constituent of many plant essential oils, in normotensive rats **Life Sciences**, v. 74, p. 2401-2412, 2004.
- LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil,

- thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001. apud ARAÚJO, I. G. A. Efeitos Hipotensor e Vasorrelaxante do Óleo Essencial de *Lippia microphylla* Cham. e de seu Constituinte Principal Timol: Envolvimento do Bloqueio de Canais para Cálcio. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2011.
- LATORRE, R.; OBERHAUSER, A.; LABARCA, P.; ALVAREZ, O. Varieties of calcium-activated potassium channels. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 385-399, 1989.
- LEMOES, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; BARBOSA, R. C. S. B.; LIMA, E. O. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants. **Fitoterapia**, v. 63, p. 266-268, 1992. Apud PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.
- LESAGE, F.; LAZDUNSKI, M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, 279 (5).F793-801, 2000.
- LIMA, J. T. Ação espasmolítica do 3, 4, 5, 8-tetrametoxi-(6, 7, 2'', 3'')-furanoflavona. Obtida de *Diplotropis ferruginea* Benth. (FABACEAE), envolve ativação de canais de potássio. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2004.
- LIMA, J. T. Caracterização do envolvimento dos BK_{Ca} no mecanismo de ação espasmolítica de diplotropina em íleo de cobaia e útero de rata e estudo comparativo do seu análogo sintético. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2008.
- LIMA, M. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; DE SANTANA, W. A.; MARTINS KANETO, C.; PEREIRA SOARES, M. B.; VILLARREAL, C. F. Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. **European Journal of Pharmacology**, v. 699, n. 1-3, p. 112-117, 2013.
- LIS-BALCHIN, M.; HART, S.; ROTH, G. The spasmolytic activity of the essential oils of scented *Pelargonium* (Geraniaceae). **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 8, p. 583-584, 1997.
- LÓPEZ, A. A. M.; ROJAS, H. N. M.; JIMÉNEZ, M. C. A. Plants extracts with cytostatic properties growing in Cuba. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 31, p. 105-111, 1979. Apud PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.

- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**. p. 512, 2002. Apud ARAÚJO, I. G. A. Efeitos Hipotensor e Vasorrelaxante do Óleo Essencial de *Lippia microphylla* Cham. e de seu Constituinte Principal Timol: Envolvimento do Bloqueio de Canais para Cálcio. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2011.
- LORENZI, H; SOUZA, H. S. Plantas ornamentais do Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, Nova Odessa. p. 1030-1056, 2001.
- MA, J.; PAN, Z. Retrograde activation of store-operated calcium channel. **Cell Calcium**, v. 33, n. 5-6, p. 375-384, 2003.
- MACÊDO, C. L. Envolvimento dos canais de K⁺ na ação espasmolítica do ácido labda 8-(17), 12E, 14-trien-18-oico (labdano-302) isolado de *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hill & Tul. em óleo isolado de cobaia. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2008.
- MACKINNON, R. Potassium channels. **FEBS Letters**, v. 555, n. 1, p. 62-65, 2003.
- MADEIRA, S. V. F.; RABELO, M.; SOARES, P. M. G.; SOUZA, P. M. G.; MEIRELES, A. V. P.; MONTENEGRO, C.; LIMA, R. F.; ASSREUY, A. M. S.; CRIDDLE, D. N. Temporal variation of chemical composition and relaxant action of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) on guinea-pig ileum. **Phytomedicine**, v. 12, p. 506-509, 2005.
- MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Spasmolytic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 18, p. 539-546, 2004.
- MAKHLOUF, G. M.; MURTHY, K. S. Signal Transduction in Gastrointestinal Smooth Muscle. **Cellular Signalling**, v. 9, n. 3, p. 269-276, 1997.
- MARTINS, I. R. R.; SANTOS, R. F.; CORREIA, A. C. C.; OLIVEIRA, G. A.; MACÊDO, C. L.; MONTEIRO, F. S.; SANTOS, P. F.; CAVALCANTE, F. A.; TAVARES, J. F.; SILVA, B. A. Relaxant effect of *Ent-7 α* -hydroxytrachyloban 18-oic acid, a trachylobane diterpene from *Xylopia langsdorfiana* A. St-Hil. & Tul., on tracheal smooth muscle. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 49, p. 15-25, 2013.
- MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará. p. 344, 2000. Apud ARAÚJO, I. G. A. Efeitos Hipotensor e Vasorrelaxante do Óleo Essencial de *Lippia microphylla* Cham. e de seu Constituinte Principal Timol: Envolvimento do Bloqueio de Canais para Cálcio. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2011.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, p. 267, 2002. Apud ARAÚJO, I. G. A. Efeitos Hipotensor e Vasorrelaxante do Óleo Essencial de *Lippia microphylla* Cham. e de seu Constituinte Principal Timol: Envolvimento do Bloqueio de Canais para Cálcio. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2011.

McFADZEAN, I.; GIBSON, A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. **The British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 1-13, 2002.

MCHALE, N.; HOLLYWOOD, M.; SERGEANT, G.; THORNBURY, K. Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle. *The Journal of Physiology*, v. 570, n. 1, p. 23-28, 2006.

MEDEIROS, M. A. A. Mecanismo de ação tocolítica de piplartina, alcalamida isolada de *Piper tuberculatum* Jacq., envolve bloqueio de cálcio. **Dissertação (mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2006.

MEERA, P.; ANWER, K.; MONGA, M.; OBERTI, C.; STEFANI, E.; TORO, L.; SAMBOR, B. M. Relaxin stimulates myometrial calcium-activated potassium channel activity via protein kinase A. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**, v. 38, n. 2, p. C312-C317, 1995.

MOREIRA, R. C. R.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C.; BEZERRA, J. L.; GUERRA, R. N. M.; REBÊLO, J. M. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; COSTA, J. M. L. Efeito leishmanicida in vitro de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia [online]**, v. 17, n. 1, p. 59-63, 2007.

MORGAN, J. P.; MORGAN, K. G. Vascular smooth muscle: the first recorded Ca^{2+} transients. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 395, p. 75-77, 1982.

MORTON, J. F. **Atlas of Medicinal Plants of Middle America**, Springfield, Illinois, USA, v. 1 p. 745-750, 1981. Apud PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.

MURTHY, K. S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. **Annual Review of Physiology**, v. 68, n. 1, p. 345-374, 2006.

NEERING, I. R.; MORGAN, K. G. Use of aequorin to study excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscle. **Nature**, v. 288, p. 585-587, 1980.

NEILD, T. O.; KOTACHA, N. Relation between membrane potential and contractile force in smooth muscle of the rat tail artery during stimulation by norepinephrine,

5-hydroxytryptamine, and potassium. **Circulation Research**, v. 60, n. 5, p. 791-795, 1987.

NELSON, M. T.; STANDEN, N. B.; WORLEY, J. F. Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. **Nature**, v. 336, p. 3382-3385, 1988.

NEUBIG, R. R.; SPEDDING, M.; KENAKIN, T.; CHRISTOPOULOS, A. International union of pharmacology committee on receptor nomenclature and drug classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 597-606, 2003.

OLIVEIRA, A. P.; FURTADO, F. F.; ALMEIDA, F. R. C.; MEDEIROS, I. A. Involvement of calcium activated large conductance potassium channel BK_{ca} in vasorelaxant effect of labdane-302. In: XXXVI Congresso brasileiro de farmacologia, 2004, Águas de Lindóia-SP. XXXV **Congresso Brasileiro de Farmacologia**. São Paulo-SP: SBFTE, v. ÚNICO, p. 268-269, 2004.

OLIVEIRA, A. P.; FURTADO, F. F.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; MAFRA, R. A.; ARAÚJO, D. A.; CRUZ, J. S.; MEDEIROS, I. A. Calcium channel blockade as a target for the cardiovascular effects induced by the 8 (17), 12E, 14-labdatrien-18-oic acid (labdane-302). **Vascular Pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 338-344, 2006.

OLIVEIRA, G. A. A ação espasmolítica do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. e de seus constituintes majoritários envolve o bloqueio do influxo de cálcio em íleo de cobaia. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2013.

OLIVEIRA, G. A.; TRAVASSOS, R. A.; SOUZA, I. L. L.; MARTINS, I. R. R.; CARREIRO, J. N.; CORREIA, A. C. C.; Pereira, J. C.; FERREIRA, T. F.; SILVA, M. C. C.; TAVARES, J. F.; SILVA, B. A. Essential oil of *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) shows spasmolytic effect on guinea-pig trachea and ileum. **44th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Foz do Iguaçu, Paraná, 2012.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.

PEIXOTO-NEVES, D.; SILVA-ALVES, K. S.; GOMES, M. D. M.; LIMA, F. C.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C.; CECCATTO, V. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique Fundamentale & Clinical Pharmacology**, v. 24, p. 341-350, 2010.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PRAKASH, O.; KASANA, V. K.; PANT, A. K.; ZAFAR, A.; HORE, S. K.; MATHELA, C. S. Phytochemical composition of essential oil from seeds of *Zingiber roseum* Rosc. and its antispasmodic activity in rat duodenum. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 344-347, 2006.

PUETZ, S.; LUBOMIROV, L. T.; PFITZER, G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 24, p. 342-356, 2009.

RADÜNZ, L. L. Efeitos da temperatura do ar de secagem sobre a qualidade do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, v. 27, n. 3, p. 09-13, 2002.

RATZ, P. H.; BERG, K. M.; URBAN, N. H.; MINER, A. S. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as calcium-sensitizing stimulus. **American Journal Physiology Cell Physiology**, v. 288, p. C769-C783, 2005.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány; M. **Biochemistry of Smooth Contraction**. San Diego, Academic Press, p. 227-239, 1996.

REMBOLD, C. M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension**, v. 20, n. 2, p. 129-137, 1992.

REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Depolarization-Dependent Effect of Flavonoids in Rat Uterine Smooth Muscle Contraction Elicited by CaCl₂. **General Pharmacology**, v. 29, n. 5, p. 847-857, 1997.

RIBEIRO, L. A. A. A ação relaxante do ácido labda-8(17),12E,14-trien-18-oico, diterpeno isolado de *Xylopia langsdorffiana* A. St.-Hil. & Tul. (Annonaceae), envolve canais de potássio. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2003.

RIBEIRO, L. A. A. Estudo do efeito relaxante do ácido 8(17),12e,14-labdatrieno-18-oico (labdano-302): um novo diterpeno ativador da via da ciclase de adenilil? 2007. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2007.

RIBEIRO, L. A. A.; TAVARES, J. F.; ANDRADE, N. C.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A. O. Ácido (8)17,12E,14-labdatrieno-18-oico (labdano302), diterpeno tipo labdano isolado de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae) relaxa a traquéia isolada de cobaia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 197-203, 2007a.

RODRIGUES, F. F. G.; COUTINHO, H. D. M.; CAMPOS, A. R.; LIMA, S. G.; COSTA, J. G. M. Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Lippia microphylla* Cham. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 33, n. 2, p. 141-144, 2011.

ROSA, C.; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311-318, 2011.

SAAD, G. A.; LÉDA, P. H. O.; SÁ, I. M.; SEIXLACK, A. C. **Fitoterapia Contemporânea: Tradição e Ciência na Prática Clínica**, Rio de Janeiro: Elsevier, p. 29-59, 2009.

SADRAEI, H.; GHANNADI, A.; MALEKSHAHI, K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions, **Fitoterapia**, v. 74, p. 445-452, 2003.

SALIMENA, F. R. G. Revisão taxonômica de *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae). **Tese (Doutorado)**. Universidade de São Paulo, 2000. Apud SAMPAIO, F. Hipóteses filogenéticas de espécies sul americanas do gênero *Lippia* spp. (Verbanaceae) com base em sequências nucleotídicas. **Dissertação (Mestrado)**. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2009.

SANDERS, K. M. Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 1438-1449, 2001.

SANDERS, R. W. The genera of Verbenaceae in the Southeastern United States, **Havard Papers in Botany**, v. 5, p. 303-358, 2001. Apud SAMPAIO, F. Hipóteses filogenéticas de espécies sul americanas do gênero *Lippia* spp. (Verbanaceae) com base em sequências nucleotídicas. **Dissertação (Mestrado)**. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2009.

SANTOS, J. S.; MELO, J. I. M.; ABREU, M. C.; SALES, M. F. Verbenaceae *sensu stricto* na região de Xingó: Alagoas e Sergipe, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 985-998, 2009.

SANTOS, R. F.; ISOBE, M. T. C.; LALLA, J. G.; HABER, L. L.; MARQUES, M. O. M.; MING, L. C. Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 14, n. esp., p. 224-234, 2012.

SARSERO, D.; FUJIWARA, T.; MOLENAAR, P.; ANGUS, J. A. Human vascular to cardiac tissue selectivity of L- and T-type calcium channel antagonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, p. 109-119, 1998.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia Racional**. 1 ed. Editora: Manole, São Paulo, 2002.

SCHURT, D. A.; TRASSATO, L. B.; SOUZA, G. R.; SILVA, W. L. M. Uso de óleo essencial de *Lippia microphylla* na inibição do crescimento in vitro de *Rhizoctonia solani*. **45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. Manaus, Amazonas, 2012.

SCHUSTER, S.; MARHL, M.; HÖFER, T. Modelling of simple and complex calcium oscillations. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 1333-1355, 2002.

SHIKADA, K.; TANAKA, S. K⁺ channel openers produce epithelium-dependent relaxation of the guinea-pig trachea. **European Journal of Pharmacology**, v. 282, n. 1-3, p. 193-197, 1995.

SHMIGOL, A.; EISNER, D. A.; WRAY, S. Properties of voltage-activated [Ca²⁺] transients in single smooth muscle cells isolated from pregnant rat uterus. **Journal of Physiology (Lond)**, v. 511, p. 803-811, 1998.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1053-1071, 1998. Apud CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura** [online], v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em <<http://www.sigmaaldrich.com>>. Acesso em: 23/08/2013 às 01h35'08".

SILVA, B. A.; NOUAILHETAS, V. L. A.; ABOULAFIA, J. Desensitization to ANG II in guinea-pig ileum depends on membrane repolarization: role of maxi-K⁺ channel. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**, v. 277, n. 4, p. C739-C745, 1999.

SILVA, E. G.; FREDIANI-NETO, E.; FERREIRA, A. T.; PAIVA, A. C. M.; PAIVA, T. B. Role of Ca²⁺-dependent K-channel in the membrane potential and contractility of aorta from spontaneously hypertension rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 113, n. 3, p. 1022-1028, 1994.

SILVA, E. G.; OKUYAMA, P.; PAIVA, T. B. Role of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in the membrane potential and contractility of uterus from spontaneously hypertensive rats. **Pathophysiology**, v. 3, n. 4, p. 259-265, 1996.

SILVA, K. M. Investigação das atividades tóxica e antidiarréica de *Xylopiá langsdorffiana* (Annoaceae). **Trabalho de Conclusão de Curso**. Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, 2010.

SILVA, M. I. G.; MELO, C. T. V.; VASCONCELOS, L. F.; CARVALHO, A. M. R.; SOUSA, F. C. F. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 193-207, 2012.

SIXEL, P. J.; PECINALLI, N. R. Características Farmacológicas Gerais Das Plantas Medicinais. **Infarma**, v. 16, n. 13/14, p. 74-77, 2005.

SLOWING BARILLAS, K. V. Estudio de la Actividad Antiinflamatoria de Diversas Especies de la Flora de Guatemala. **Memoria Doctoral**. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 1992. Apud PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses,

chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, n. 6503, p. 231-236, 1994.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca^{2+} Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 4, p. 1325-1358, 2003.

SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 159 p. 129-145, 1968.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica e Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Instituto Plantarum**, São Paulo, 2005. Apud SAMPAIO, F. Hipóteses filogenéticas de espécies sul americanas do gênero *Lippia* spp. (Verbanaceae) com base em sequências nucleotídicas. 2009. **Dissertação (Mestrado)**. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2009.

SPEDDING, M.; PAOLETTI, R. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. **Pharmacology Reviews**, v. 44, p. 363-376, 1992.

STROBL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 29-41, 2000. Apud CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura** [online], v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

SUN, Y. D. & BENISHIN, C. G. K^+ channel openers relax longitudinal muscle of guinea-pig ileum. **European Journal of Pharmacology**, v. 271, p. 453-459, 1994.

TAVARES, E. S.; JULIÃO, L. S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2005.

TEÓFILO, T. M. N. G. Efeito antiespasmódico do óleo essencial da *Lippia sidoides* Cham. e seus constituintes, timol, para-cimeno e beta-cariofileno, sobre o músculo liso traqueal de ratos. **Dissertação (Mestrado em Acadêmico em Ciências Fisiológicas)**, Universidade Estadual do Ceará, 2012.

TERAMOTO, N.; BRADING, A. F.; ITO, Y. Glibenclamide-sensitive K^+ channels underlying levromakalim-induced relaxation in pig urethra. **European Journal of Pharmacology**, v. 365, n. 2-3, p. 291-300, 1999.

TERAMOTO, N.; NAKASHIMA, T.; ITO, Y. Properties and pharmacological modification of ATP-sensitive K^+ channels in cat thacheal myocytes. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 3, p. 625-635, 2000.

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 83, p. 215-242, 2005.

TOMITA, T. Electrical activity (spikes and slow waves) in gastrointestinal smooth muscles. In: **Smooth Muscle: An Assessment of Current Knowledge**, p. 127-156, 1981.

TONG, F.; GROSS, A. D.; DOLAN, M. C.; COATS, J. R. The phenolic monoterpeneoid carvacrol inhibits the binding of nicotine to the housefly nicotinic acetylcholine receptor. **Pest Management Science**, v. 69, n. 7, p. 775-780, 2012.

TRAVASSOS, R. A. Caracterização do mecanismo de ação tocolítica do ácido labda 8-(17), 12E, 14-trien-18-oico (labdano-302) isolado de *Xylopija langsdorfiana* A. St.-Hill & Tul. em útero isolado de rato. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2010.

TRAVASSOS, R. A.; MACÊDO, C. L.; CORREIA, A. C. C.; PESSÔA, H. L. F.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A. Involvement of K⁺ channels on tocolytic effect and investigation of hemolytic activity of labdane-302. In: **41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, Ribeirão Preto, São Paulo, 2009.

UYAMA, Y.; IMAIZUMI, Y.; WATANABE, M. Cyclopiazonic acid, an inhibitor of Ca²⁺-ATPase in sarcoplasmic reticulum, increases excitability in ileal smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 2, p. 565-572, 1993.

VALEZE, F. H.; BRENZAN, M. A. Perfil de utilização de medicamentos fitoterápicos pela população do município de Boa Esperança-PR. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 6, n. 1, p. 17-24, 2011.

VAN BREEMEN, C.; AARONSON, P.; LOUTZENHISER, R. Sodium-Calcium interaction in mammalian smooth muscle. **Pharmacology Reviews**, v. 30, p. 167-208, 1979.

VICINI, L. F.; PIERRE, P. M. O.; PRAÇA, M. M.; COSTA, D. C. S.; ROMANEL, E. C.; SOUSA, S. M.; PEIXOTO, P. H. P.; SALIMENA, F. R. G. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, p. 171-178, 2005.

VIEGAS-JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VOGALIS, F. Potassium channels in gastrointestinal smooth muscle. **Journal of Autonomic Pharmacology**, v. 20, p. 207-219, 2000.

VOGALIS, F.; WARD, S. M.; SANDERS, K. M. Correlation between electrical and morphological properties of canine pyloric circular. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 260, p.390-398, 1991.

WADE, G. R.; SIMS, S. M. Muscarinic stimulation of tracheal smooth muscle cell activates large-conductance Ca^{2+} -dependent K^{+} channel. **American Journal of Physiology**, v. 265, n. 3, p. C658-C665, 1993.

WATERMAN, S. A. Voltage-gated calcium channels in autonomic neuroeffector transmission. **Progress in Neurobiology**, v. 60, n. 2, p. 181-210, 2000.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, p. 201-206, 2003.

WOODRUM, D. A.; BROPHY, C. M. The paradox of smooth muscle physiology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 177, n. 1-2, p. 135-143, 2001.

WRAY, S. Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. **American Journal of Physiology**, v. 264, p. C1-C18, 1993.

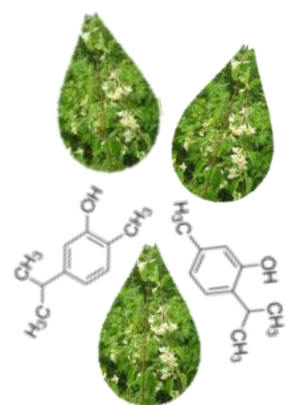
WRAY, S.; JONES, K.; KUPITTAYANANT, S.; LI, Y.; MATTHEW, A.; MONIR-BISHTY, E.; NOBLE, K.; PIERCE, S. J.; QUENBY, S.; SHMYGOL, A. V. Calcium signaling and uterine contractility. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 10, p. 252-264, 2003.

WRAY, S.; KUPITTAYANANT, S.; SHMYGOL, A.; SMITH, R. D.; BURDYGA, T. V. The physiological basis of uterine contractility: a short review. **Experimental Physiology**, v. 86, p. 239-246, 2001.

XAVIER, A. L. Estudo do potencial antitumoral do óleo essencial das folhas de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) e sua toxicidade. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2011.

YAMAKAGE, M.; HIRSHMAN, C. A.; CROXTON, T. L. Sodium nitroprusside stimulates Ca^{2+} -activated K^{+} channels in porcine tracheal smooth muscle cells. **American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 14, n. 3, p. L338-L345, 1996.

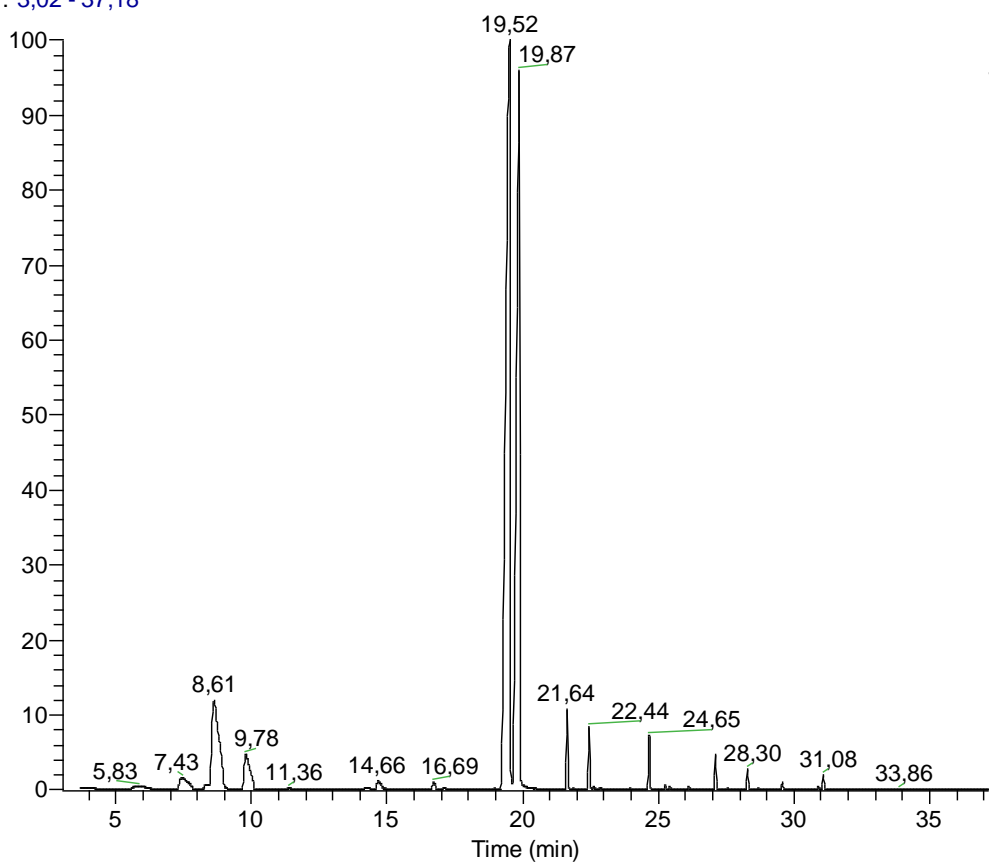
ZAVALA, M.; MACÍAS, A.; OROPEZA, M.; CÁRDENAS, N.; PONCE-MONTER, H.; CAMPOS, M. G.; PÉREZ, S.; PÉREZ, C. Chemical composition and antispasmodic effect of *Casimiroa pringlei* essential oil on rat uterus. **Fitoterapia**, v. 79, p. 446-450, 2008.



Anexos

Anexo 1 – Cromatograma do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae).

RT: 3,02 - 37,18



NL:
1,58E9
TIC F: MS
LIPPIAMAC
ROPHYLAF
OLHA

MAIA, J. G. S; ANDRADE, E. H. A.

Anexo 2 – Tabela dos constituintes químicos presentes no óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae).

IR	Folhas de <i>Lippia microphylla</i> Cham.	%Área
929	α -pineno	0,51
988	mirreno	1,4
1014	α -terpineno	0,2
1023	p-cimeno	9,0
1055	γ -terpineno	2,92
1088	p-cimeneno	0,1
1097	hidrato de trans-sabineno	0,1
1128	aloocimeno	0,1
1133	cis-p-menta-2,8-dien-1-ol	0,1
1170	umbelona	0,12
1179	4-terpineol	0,57
1182	p-cimen-8-ol	0,1
1186	α -terpineol	0,1
1227	metiltimol	0,28
1236	metilcarvacrol	0,20
1293	timol	46,52
1301	carvacrol	31,74
1343	acetato de carvacrol	1,61
1362	acetato de timol	1,32
1415	β -cariofileno	1,15
1430	trans- α -bergamoteno	0,11
1451	α -humuleno	0,06
1476	butylated hydroxy anisole	0,68
1505	β -bisaboleno	0,42
1537	espatulenol	0,16
1576	óxido de cariofileno	0,42
	Total	99,99

IR = índice de retenção

MAIA, J. G. S; ANDRADE, E. H. A.

Anexo 3 – Certidão de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/CBiotec).

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIDÃO**

João Pessoa, 28 de maio de 2013.

CEUA Nº **1005/13**Ilmo(a). **Bagnólia Araújo da Silva**

Departamento Ciências Farmacêuticas - CCS - UFPB

Orientando(a) : **Maria da Conceição Correia Silva, (Outros (Justificar))**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **27/05/13** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **Investigação da atividade tocolítica do óleo essencial de Lippia microphylla Cham. (Verbenaceae) e de seus constituintes majoritários, timol e carvacrol.**

Com previsão de empregar **80 Ratas WISTAR;****- ANIMAIS****PROVÉM DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.**Para serem utilizados no período de **01/06/2013 a 30/08/2013**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – CBiotec
Centro de Biotecnologia – Universidade Federal da Paraíba
<https://sites.google.com/site/ceuacbiotec/> – ceua@ltf.ufpb.br